

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-509840

(43) 公表日 平成11年(1999) 8月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	M
31/00	6 0 1	31/00	6 0 1
			6 0 1 K
	6 0 9		6 0 9 F
	6 1 1		6 1 1 C
審査請求 未請求		予備審査請求 有	(全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-504031	(71) 出願人	ジェネンテック インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成8年(1996) 6月26日		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080
(85) 翻訳文提出日	平成10年(1998) 1月5日		-4990 サウスサンフランシスコ ディー
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 1 1 0 3 3		エヌエー ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 0 1 3 5 4	(72) 発明者	ヒーベルト, キャロライン エー
(87) 国際公開日	平成9年(1997) 1月16日		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94133
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 9 1 , 3 3 4		サンフランシスコ グリーン ストリー
(32) 優先日	1995年6月27日		ト 822エー
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(72) 発明者	カバコフ, ローナ シー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044
			パシフィカ グラナダ ドライヴ 1084
		(74) 代理人	弁理士 志賀 正武 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患と喘息の治療における I L - 8 拮抗剤

(57) 【要約】

I L - 8 拮抗剤を用いた喘息の治療法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 哺乳動物における喘息を治療するための薬剤の製品におけるIL-8拮抗剤の使用。
2. 喘息がアレルギー性喘息である請求項1の使用。
3. 哺乳動物がヒトである請求項1の使用。
4. IL-8拮抗剤がIL-8に応じた好中球走化性を阻害する請求項1の使用。
5. IL-8拮抗剤が好中球によるIL-8介在性エラスターゼ放出を阻害する請求項1の使用。
6. IL-8拮抗剤がヒト好中球に対するヒトIL-8の結合を阻害する請求項1の使用。
7. 上記薬剤が哺乳動物における喘息の発症前に哺乳動物に投与される請求項1の使用。
8. 上記薬剤が哺乳動物における喘息の発症後に哺乳動物に投与される請求項1の使用。
9. IL-8拮抗剤が抗IL-8抗体である請求項1の使用。
10. 抗IL-8抗体がモノクローナル抗体である請求項9の使用。
11. 抗IL-8抗体がキメラ抗体である請求項10の使用。
12. 抗IL-8抗体がヒト化抗体である請求項10の使用。
13. 抗IL-8抗体が6G4.2.5の相補性決定領域を持つ請求項10の使用。
14. 抗IL-8抗体が5.12.14の相補性決定領域を持つ請求項10の使用。
15. 哺乳動物にIL-8拮抗剤の有効量を投与することを含む哺乳動物における喘息の治療法。
16. 喘息がアレルギー性喘息である請求項15の方法。
17. 哺乳動物がヒトである請求項15の方法。
18. IL-8拮抗剤がIL-8に応じた好中球走化性を阻害する請求項15の方法。
19. IL-8拮抗剤が好中球によるIL-8介在性エラスターゼ放出を阻害する請求項15の方法。
20. IL-8拮抗剤がヒト好中球に対するヒトIL-8の結合を阻害する請求項15の方法

。

21. IL-8拮抗剤が哺乳動物における喘息の発症前に投与される請求項15の方法。
22. IL-8拮抗剤が哺乳動物における喘息の発症後に投与される請求項15の方法。
23. IL-8拮抗剤が抗IL-8抗体である請求項15の方法。
24. 抗IL-8抗体がモノクローナル抗体である請求項23の方法。
25. 抗IL-8抗体がキメラ抗体である請求項24の方法。
26. 抗IL-8抗体がヒト化抗体である請求項25の方法。
27. 抗IL-8抗体が6G4.2.5の相補性決定領域を持つ請求項24の使用。
28. 抗IL-8抗体が5.12.14の相補性決定領域を持つ請求項24の使用。

【発明の詳細な説明】

炎症性疾患と喘息の治療におけるIL-8拮抗剤

発明の分野

本出願は抗インターロイキン-8(IL-8)抗体のようなIL-8拮抗剤と、炎症性疾患および喘息の治療におけるそれらの使用法に関する。

発明の背景

インターロイキン-8(IL-8)は、炎症性メディエーターに応じて様々な細胞によって分泌される好中球走化性ペプチドである(Hebert等,Cancer Investigation 11(6):743(1993))。IL-8は、成人性呼吸促進症候群(ARDS)、敗血症性ショックそして多発性器官機能不全のような炎症性疾患の病因において、重要な役割を果たしうる。上記炎症性疾患に対する免疫治療は、好IL-8抗体を用いた非罹患患者の治療を含み得る。

Sticherling等,(J.Immunol.143:1628(1989))は、IL-8に対する四つのモノクローナル抗体の生産と特性を開示している。1992年3月19日に印刷されたW092/04372は、IL-8とIL-8のペプチド類似体の受容体接触部位に作用するポリクローナル抗体と、それに加えて患者の炎症性応答を予防するための該抗体の使用法を開示している。St.John等(Chest 103:932(1993))は、抗IL-8抗体の潜在的な治療上の使用を含むARDS、敗血症性ショックそして多発性器官機能不全に対する免疫治療をレビューしている。Sekido等,(Nature 365:654(1993))は、IL-8に対するモノクローナル抗体によるウサギにおける肺再灌流傷害の予防法を開示している。Mulligan等(J.Immunol.150:5585(1993))は、ラットでの炎症性肺傷害における、ヒトIL-8に対するネズミモノクローナル抗体の促進効果を開示している。

本発明の抗IL-8モノクローナル抗体は、細菌性肺炎および炎症性結腸疾患のような他の炎症性疾患の治療において治療学的に用い得ることを本発明は証明する。

加えて抗IL-8抗体はIL-8のアッセイに対する試薬としても有用である。例えば、Sticherling等(Arch.Dermatol.Res.284:82(1992))は、免疫組織化学的研究における試薬としての抗IL-8モノクローナル抗体の使用法を開示している。Ko等(J.Immunol.150:1000(1993))は、抗IL-8モノクローナル抗体を用いた炎症性疾患の治療における試薬としての抗IL-8モノクローナル抗体の使用法を開示している。

unol.Methods 149:227(1992))は、IL-8に対する固相酵素免疫検定法(ELISA)における試薬としての抗IL-8モノクローナル抗体の使用法を開示している。

さらに本発明は、抗IL-8モノクローナル抗体を含むIL-8拮抗剤が喘息の治療において治療学的に用い得ることを説明する。

発明の概要

本発明は治療学的に有効量のIL-8拮抗剤を投与することを含む患者における喘息の治療法を提供する。本発明の方法は喘息の発症前および/または後に患者にIL-8拮抗剤を投与することを提供する。

一面では、本発明は抗IL-8抗体を用いた喘息の治療法を提供する。

さらなる一面では、本発明はIL-8の好中球への結合を阻害するIL-8拮抗剤を用いた喘息の治療法を提供する。

またさらなる一面では、本発明はIL-8によって誘発される好中球走化性を阻害するIL-8拮抗剤を用いた喘息の治療法を提供する。

さらに一面では、本発明はIL-8によって誘発される好中球エラスターゼ放出を阻害するIL-8拮抗剤を用いた喘息の治療法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は好中球によるIL-8介在性エラスターゼ放出の、抗IL-8モノクローナル抗体5.12.14によるブロックを表すグラフである。

図2は ^{125}I -IL-8の好中球に対する結合の、非ラベルIL-8による阻害を表すグラフである。

図3はFabにマッチするネガティブアイソタイプが、 ^{125}I -IL-8のヒト好中球に対する結合を阻害しないことを説明する。

図4は ^{125}I -IL-8の好中球に対する結合の、1.6ナノモル/リットル(nM)の平均 IC_{50} を持つキメラ5.12.14Fabによる阻害を表すグラフである。

図5は ^{125}I -IL-8の好中球に対する結合の、50%結合阻害(IC_{50})を成し遂げるために必要とされる平均濃度が7.5nMであるキメラ6G.4.25Fabによる阻害を表すグラフである。

図6はヒトIL-8介在性好中球走化性の、キメラ6G4.2.5Fabおよび5.12.14Fabに

よ

る阻害を説明する。

図7はウサギIL-8介在性好中球走化性を阻害するためのキメラ6G4.2.5Fab及びキメラ5.12.14Fabの相対的能力を説明する。

図8は様々な濃度のヒトおよびウサギIL-8による、ヒト好中球からのエラスターゼ放出の刺激を表す。エラスターゼ放出の相対的範囲は405ナノメートル(nm)の波長での吸光度の測定により見積もった。データは3個のサンプルの平均±平均の標準誤差(SEM)を表す。

図9はヒトIL-8によって刺激されたヒト好中球からのエラスターゼ放出を阻害する、キメラ6G4.2.5Fabおよびキメラ5.12.14Fabの能力を表すグラフである。その結果は100nMのIL-8単独によって導き出されるエラスターゼ放出のパーセンテージを反映するために標準化された。データは異なる血液ドナーを用いて異なる日に実施された三つの独立の実験の平均±SEMを表す。IC₅₀値は四つのパラメーターをフィットさせて計算された。

図10はウサギIL-8によって刺激されたヒト好中球からのエラスターゼ放出を阻害する、キメラ6G4.2.5Fabおよびキメラ5.12.14Fabの相対的能力を表すグラフである。その結果は100nMのIL-8単独によって導き出されるエラスターゼ放出のパーセンテージを反映するために標準化された。データは異なる血液ドナーを用いて異なる日に実施された三つの独立の実験の平均±SEMを表す。IC₅₀値は四つのパラメーターをフィットさせて計算された。

a-jの図から成る図11はウサギ潰瘍性結腸炎モデルにおける以下のパラメーターを表す一連のグラフである:(a)組織内のミエロペルオキシダーゼ濃度;(b)組織内のIL-8濃度;(c)結腸重量;(d)全炎症;(e)浮腫;(f)壊死の範囲;(g)壊死のひどさ;(h)好中球辺縁趨向;(i)好中球侵入;(j)単核白血球侵入。

図12は肺炎連鎖球菌、大腸菌または緑膿菌に感染した動物における気管支肺胞洗浄(BAL)液内の好中球数に対する、抗IL-8モノクローナル抗体治療の効果を表すグラフである。6G4.2.5を用いた治療では、アイソタイプコントロールマウスIgGを用いて治療された動物と比較してBAL液内に存在する好中球の数は有意に減

少しした。

図13はL鎖とH鎖のそれぞれのためにデザインされた三つのプライマーのDNA配列を表す。モノクローナル抗体5.12.14のL鎖とH鎖の可変領域をクローニングするこ

とを目的とし、プライマーハイブリダイゼーションの機会と第一ストランドcDNA合成の効率を高めるために複数のプライマーがデザインされた。

図14は5.12.14L鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーと一つの逆のプライマーのDNA配列を表す。

図15は5.12.14H鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーと一つの逆のプライマーのDNA配列を表す。

図16は5.12.14L鎖可変領域のDNA配列を表す。相補性決定領域(CDR)はX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。重要な制限部位はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミL鎖可変領域は1から109アミノ酸である。ネズミL鎖定常領域の一部が110から123アミノ酸(イタリック)である。

図17は5.12.14H鎖可変領域のDNA配列を表す。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。重要な制限部位はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミH鎖可変領域は1から120アミノ酸である。ネズミH鎖定常領域の一部が121から130アミノ酸(イタリック)である。

図18はネズミL鎖およびH鎖定常領域をヒトの各鎖の同等なものに変換するために用いられる増幅プライマーのDNA配列である。

図19は5.12.14L鎖可変領域およびヒトIgG1L鎖定常領域に対するコード配列である。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。ヒト定常領域はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミL鎖可変領域は1から109アミノ酸である。ヒトL鎖定常領域は110から215アミ

ノ酸である。

図20は5.12.14H鎖可変領域およびヒトIgG1H鎖定常領域に対するコード配列である。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。ヒト定常領域はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミH鎖可変領域は1から120アミノ酸である。ヒトH鎖定常領域は121から229アミノ酸である。

る。

図21はL鎖とH鎖のそれぞれのためにデザインされた三つのプライマーのDNA配列を表す。モノクローナル抗体6G4.2.5のL鎖とH鎖の可変領域をクローニングすることを目的とし、プライマーハイブリダイゼーションの機会と第一ストランドcDNA合成の効率を高めるために複数のプライマーがデザインされた。

図22は6G4.2.5L鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーと一つの逆のプライマーのDNA配列を表す。

図23は6G4.2.5H鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーと一つの逆のプライマーのDNA配列を表す。

図24は6G4.2.5L鎖可変領域のDNA配列を表す。相補性決定領域(CDR)はX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。有用なクローニング部位はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミL鎖可変領域は1から114アミノ酸である。ネズミL鎖定常領域の一部が115から131アミノ酸(イタリック)である。

図25は6G4.2.5H鎖可変領域のDNA配列を表す。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。有用なクローニング部位はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミH鎖可変領域は1から122アミノ酸である。ネズミH鎖定常領域の一部が123から135アミノ酸(イタリック)である。

図26はネズミL鎖およびH鎖定常領域をヒトの各鎖の同等なものに変換するために用いられる増幅プライマーのDNA配列である。

図27はキメラ6G4.2.5L鎖に対するコード配列である。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。ヒト定常領域はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミH鎖可変領域は1から114アミノ酸である。ヒトH鎖定常領域は115から220アミノ酸である。

図28はキメラ6G4.2.5H鎖可変領域に対するコード配列である。CDRはX線結晶解析(アンダーラインアミノ酸)またはカバット配列比較(星印のついたアミノ酸)のそれぞれによって示されている。ヒト定常領域はイタリックで示されている。STIIのシグナルペプチドは-23から-1アミノ酸である。ネズミH鎖可変領域は1から122アミノ酸である。ヒトH鎖定常領域は123から231アミノ酸である。

図29は野生型およびIL-8受容体ホモログ(IL8Rh)ノックアウト(KO)マウスを用いた喘息モデルの肺内への、好酸球、マクロファージ、リンパ球移住に対するIL8Rh不存在の影響を表すグラフである。移住レベルは気管支肺胞洗浄(BAL)液の細胞数として提供される。以前にアレルゲンチャレンジを受けることなく、エーロゾルにして散布されたオボアルブミンアレルゲンにさらされた野生型(WT)およびIL8Rh KOコントロールマウスに対する細胞数は、それぞれ WT OVA aero、および KO OVA aero、として記述される。オボアルブミンアレルゲンを腹膜内に接種され、続いてエーロゾルにして散布されたアレルゲンにさらされた野生型マウスとIL8Rh KOマウスに対する細胞数は、それぞれ WT OVA ip/aero、および KO OVA ip/aero、として記述される。好酸球、マクロファージ、リンパ球および好中球細胞数はそれぞれ斜線、ハッチ、縦線及び塗りつぶした各棒グラフで表されている。

図30は野生型およびIL8Rhノックアウトマウスを用いた喘息モデルにおける末梢の好酸球数に対するIL8Rh不存在の影響を表すグラフである。末梢の好酸球レベルは循環血好酸球細胞数として提供される。オボアルブミンアレルゲンを腹膜内(ip)に接種され、続いてエーロゾルにして散布されたアレルゲンにさらされた

野生型マウスとKOマウスに対する細胞数は、それぞれ WT、および KO、として記述される。0日(アレルゲンの腹膜内接種前)に得られた細胞数は、斜線の棒グラフで表されている。21日(エーロゾルにして散布されたアレルゲンチャレンジの終了に引き続く日)に得られた細胞数は塗りつぶした棒グラフで表されている。

図31は野生型およびIL8Rhノックアウト(KO)マウスを用いた喘息モデルにおける肺への好酸球移住と末梢の好酸球増殖に対するIL8Rh不存在の影響を表すグラフである。好酸球移住はBAL液好酸球数として提供されている(斜線の棒グラフ)。循環血好酸球数は塗りつぶした棒グラフとして提供されている。WTおよびIL8Rh KOマウスのipアレルゲン接種の前の0日に得られた細胞数は、それぞれ WT day 0、および KO day0、として表されている。WTおよびIL8Rh KOマウスのエーロゾルにして散布されたアレルゲンチャレンジの終了に引き続く日に得られた細胞数は、それぞれ WT day21、および KO day21、として表されている。

図32は始めにオボアルブミンアレルゲンのip接種でチャレンジされ、続いてアレルゲンエーロゾルでチャレンジを受けたWTおよびIL8Rh KOマウスにおける二次IgE応答を表すグラフである。以前にアレルゲンチャレンジを受けることなくエーロゾルにして散布されたアレルゲンでチャレンジを受けたWTおよびIL8Rh KOコントロールマウスに対するアレルゲン特異的IgE力価は、それぞれ WT OVA、および KO OVA、として表されている。始めにip接種によってアレルゲンのチャレンジを受け、続いてエーロゾルにして散布されたアレルゲンにさらされたWTおよびIL8Rh KOマウスのアレルゲン特異的IgE力価は、それぞれ WT OVA ip/aero、および KO OVA ip/aero、として表されている。

図33-35は最もひどく罹患したWT喘息マウスの肺組織構造を表す顕微鏡写真である。肺組織の単一の切片の顕微鏡写真は、図33-35に示されているようにそれぞれ40×、200×そして320×倍率で得られた。図33はほとんどすべての気管支が顆粒球によりひどく侵入されていることを示す。最も罹患している部位の高倍率のものによると(図34参照)、強い単球がいくつかの好酸球に侵入していることが明らかにされている。肺胞のレベルでは(最高倍率、図35参照)、マクロファージおよび好酸球が明らかである。

図36-38は最も弱く罹患したWT喘息マウスの肺組織構造を表す顕微鏡写真である。図36-38に示されているようにそれぞれ40×、200×そして320×倍率で得られた。図36と37が示すように、最も弱く罹患した喘息マウスでは、最もひどく罹患したWTマウス(図33-35)によって存在する侵入より狭い範囲であるにもかかわらず、ほとんどの気管支内で細胞侵入が存在している。最も弱く罹患したWT動物の肺胞はまた、図38に示されているように最も少なく閉塞している。

図39-41は最もひどく罹患したIL8Rh KO喘息マウスの肺組織構造を表す顕微鏡写真である。肺組織の単一の切片の顕微鏡写真は、図39-41に示されているようにそれぞれ40×、200×そして320×倍率で得られた。図39はより大きい気管支だけが侵入されていることを示す。図39および40に示されている侵入の範囲は、最も弱く罹患したWTマウスに対する図36および37に示されているものに匹敵している。肺胞のレベルでは、少数の侵入している細胞だけが最もひどく罹患しているIL8Rh KOマウスにおいて明らかである(図41)。

好ましい実施態様の説明

A. 定義

一般的に以下の単語またはフレーズは、本記述、実施例および請求項で用いられる場合に、示された定義を意味する。

ポリメラーゼ連鎖反応、または PCR、なる語は、ごく少量の核酸、RNAおよび/またはDNAの特異的な部分を1987年7月28日に査定された米国特許第4,683,195号に記述されたように増幅する方法または技術を示す。一般的に、オリゴヌクレオチドプライマーがデザインできるように、興味ある部分の端またはそれを越える部分の配列情報を入手する必要がある;これらのプライマーは増幅されるテンプレートの反対のストランドの配列と一致するかまたは同一であろう。二つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは増幅される物質の端に一致し得る。PCRは特異的なRNA配列、全てのゲノムDNA由来の特異的なDNA配列そして全ての細胞のRNA、バクテリオファージまたはプラスミド等から転写された相補的DNA(cDNA)を増幅するために用いられる。一般的にはMullis等,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Bio 1.51:263(1987);Erlich編,PCR Technology(Stockton Press,NY,1989)参照。ここ

で用いられているように、PCRは核酸の特異的断片を増幅または生産するために既知の核酸をプライマーとして用い、核酸ポリメラーゼを用いることを含む核酸試料サンプルの増幅のための核酸ポリメラーゼ反応法の唯一ではないが一つの例であると考えられる。

抗体 γ (Ab)および免疫グロブリン γ (Ig)は同じ構造的特徴を持つ糖タンパク質である。抗体が特異的抗原に対する特異的な結合を示す一方、免疫グロブリンは抗原特異性を欠いた抗体と他の抗体様分子の両方を含む。例えば、後者の種類のポリペプチドはリンパ系によって低レベルでそしてミエローマによってより高レベルで生産される。

天然の抗体および免疫グロブリン γ は通常約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、二つの同一のL鎖と二つの同一のH鎖より成る。各L鎖は一つの共有結合のジスルフィド結合によってH鎖と結合しており、一方ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプのH鎖間で異なる。H鎖とL鎖のそれぞれも規則的に一定の間隔をあけた鎖内ジスルフィド架橋を持っている。各H鎖は一方の端に可変ドメイン(V_H)をもち、それにたくさんの定常ドメインが続く。各L鎖は一方の端に可変ドメイン(V_L)をもち、もう一方の端に定常ドメインをもつ；L鎖の

定常ドメインはH鎖の最初の定常ドメインと一直線に並び、そしてL鎖の可変ドメインはH鎖の可変ドメインと一直線に並ぶ。特定のアミノ酸残基がL鎖とH鎖の可変ドメイン間の界面を形成していると考えられている(Clothia等, J. Mol. Biol. 186:651(1985); NovotnyとHaber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4592(1985))。

可変 γ なる語は、可変ドメインの特定の部分が抗体間の配列において広く異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合と特異性において用いられるという事実を示す。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインを通して均等に配置されているわけではない。それはL鎖とH鎖の可変ドメインの両方内の相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれる三つの部分に集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分はフレームワーク(FR)と呼ばれている。天然のH鎖とL鎖の可変ドメインは、それぞれ四つのFR領域を含んでおり、それらは

主に β -シート構造を採用し、三つのCDRと結合している。その結合体は β -シート構造と接続する、そしてある場合にはその一部を形成するループを形成する。各鎖内のCDRはFR領域によって極めて近接してまとまっており、そして他の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版、National Institute of Health, Bethesda, MD(1991)参照)。定常ドメインは抗原に対する抗体の結合には直接は含まれないが、抗体依存性細胞傷害における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

抗体のパライン切断は、それぞれ単一の抗原結合部位をもつ Fab₂断片と呼ばれる二つの同一の抗原結合断片を生じ、そして残りの Fc₂断片を生じるが、後者の名前は容易に結晶化が可能なことを反映している。ペプシン処理は二つの抗原結合部位をもち、未だ抗原とクロスリンク可能なF(ab')₂断片を生じる。

Fv₂とは完全な抗原認識、そして抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域はタイトな非共有結合会合にある一つのH鎖と一つのL鎖可変ドメインの二量体より成る。この構成では、各可変ドメインの三つのCDRがV_H-V_L二量体の表面の抗原結合部位を規定するために相互作用している。一まとめにして、六つのCDRが抗体に対して抗原結合特異性を授けている。しかしながら単一の可変ドメイン(または抗原に対して特異的な三つのCDRのみを含むFvの半分)は、完全な結合部位より低いアフィニティーながら抗原を認識し結合する能力を持っている。

Fab断片はまたL鎖の定常ドメインとH鎖の最初の定常ドメイン(C_H1)を含む。Fab'断片は抗体ヒンジ領域由来の一つかそれ以上のシステインを含むH鎖C_H1ドメインのカルボキシ末端にいくつかの残基が付加されている点で、Fab断片と異なる。Fab'-SHは定常ドメインのシステイン残基(類)がフリーなチオール基をもつFab'をここでは示す。F(ab')₂抗体断片はもともと、間にヒンジシステインをもつFab'断片のペアーとして生産された。他の化学的な抗体断片の結合もまた知られている。

いかなる脊椎動物種由来の抗体(免疫グロブリン)のL鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる二つの明ら

かに別個のタイプの一つに割り当てられ得る。

H鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンには、IgA, IgD, IgE, IgGそしてIgMという五つの主要なクラスがあり、これらのいくつかは、例えばIgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁そしてIgA₂というサブクラス(アイソタイプ)にさらに分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに相当するH鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構造はよく知られている。

抗体 μ なる語は、最も広い意味で用いられ、単一のモノクローナル抗体(作用剤および拮抗剤抗体を含む)およびポリエピトープ特異性を持つ抗体構成物をも特にカバーする。

ここで用いられているようなモノクローナル抗体 μ (mAb)なる語は、実質的に同質な抗体の集団から得られる抗体を示す、すなわち集団に含まれる個々の抗体が、少量存在するであろう自然に生じ得る突然変異を除いて同一なのである。モノクローナル抗体は高い特異性を持っており、単一の抗原部位に対して向けられている。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対して向けられた異なる抗体を典型的に含むありきたりの(ポリクローナル)抗体調製物とは異なり、各mAbは抗原の単一の決定基に対して向けられている。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は他の免疫グロブリンの混ざっていないハイブリドーマカルチャーによって合成され得る点で有利である。

ここではモノクローナル抗体は、由来する種や免疫グロブリンのクラスまたはサブクラスの名称に関わらず、抗IL-8抗体の可変ドメイン(超可変ドメインを含む)

を定常ドメインに接合したもの(例えば ヒト化 μ 抗体)、L鎖をH鎖に接合したもの、ある種の鎖をもう一つの種の鎖に接合したものまたは異種構造のタンパク質の融合によるものによって生産されるハイブリッド及び組換え抗体を含む。また望ましい生物学的活性を示す範囲で、抗体断片(例えばFab, F(ab')₂およびFv)も含む。(例えば、Cabilly等, 米国特許第4,816,567号; MageとLamoyi, Monoclonal Ant

ibody Production Techniques and Applications内のpp.79-97(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)参照)。

それゆえ緩和したモノクローナルなる語は、実質的に同質の抗体の集団から得られたような抗体の性質を示し、いかなる特定の方法によって抗体を生産する必要があるとは解釈すべきではない。例えば本発明にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、KohlerとMilstein, Nature 256:495(1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法によって得られ得るし、または組換えDNA法によって也得られ得る(Cabilly等, 上記参照)。

ここでいうモノクローナル抗体は、H鎖および/またはL鎖の一部が特定の種から由来する、または特定の抗体のクラスやサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一なまたは同種構造のものであり、一方で鎖(類)における残りの部分がもう一つの特定の種から由来する、またはもう一つの特定の抗体のクラスやサブクラスに属する抗体における相当する配列と同一なまたは同種構造のものであるキメラ抗体(免疫グロブリン)をも特別に含み、また望ましい生物学的活性を示す範囲で、該抗体の断片も含まれる(Cabilly等, 上記参照; Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984))。

非ヒト(例えばネズミ)抗体のヒト化形態とは、非ヒト免疫グロブリンから由来する最小限の配列を含む、特異的なキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片(Fv, Fab, Fab', F(ab')₂または他の抗体の抗原結合部分配列)である。ほとんどの場合が、ヒト化抗体は受容者の相補性決定領域(CDR)由来の残基が、望ましい特異性、アフィニティーそして力量を持つマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(提供者抗体)のCDR由来の残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン(受容者抗体)である。ある例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、相当する非ヒト残基で置き換えられている。さらにヒト化抗体は受容者抗体にもインポートCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基

をも含み得る。これらの変形は、抗体の能力をさらに洗練し最適化するためになされる。一般的にはヒト化抗体は、少なくとも一つ、そして典型的には二つの可

変ドメインの実質的にすべてを含むであろうし、可変ドメイン内には非ヒト免疫グロブリンのものに相当するCDR領域の全てまたは実質的にすべておよびFR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた最適には、免疫グロブリンコンセンサス領域(Fc)の少なくとも一部を含み、それは典型的にはヒト免疫グロブリンのものである。さらに詳細には、Jones等,Nature 321:522(1986);Reichmann等,Nature 332:323(1988);およびPresta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593(1992)を参照。ここで用いられる IL-8拮抗剤なる語は、IL-8とIL-8受容体間の相互作用を妨害するまたはブロックすることが可能な化合物を示す。IL-8拮抗剤は、抗IL-8抗体およびそれらの断片、IL-8結合ペプチドおよびIL-8に結合し、またはIL-8受容体に結合するためにIL-8と競合することが可能な非タンパク質性小分子を含む。

治療とは、治療学上の治療及び予防のまたは予防的な方法の両方を示す。治療の必要があるものとは、すでに疾患に罹患しているものと同様に疾患に罹患しやすいものまたは疾患を予防すべきものも含む。

治療の目的としての 哺乳動物とは、ヒト、そしてイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等のような家畜および農場の動物、そして動物園、スポーツ、またはペットの動物を含む哺乳動物に分類されるあらゆる動物を示す。好ましくはここでいう哺乳動物はヒトである。

ここで用いられているように、タンパク質、ペプチドおよびポリペプチドとは、アミノ酸ポリマー、または一連の二つかそれ以上の相互作用しているまたは結合したアミノ酸ポリマーを示すために互換性をもって用いられる。

ここで用いられているように、炎症性疾患なる語は炎症の結果として起こる、典型的には好中球走化性によって引き起こされる病理学上の状態を示す。上記疾患の例としては、乾癬を含む炎症性皮膚疾患;炎症性結腸疾患(クローン病や潰瘍性結腸炎のような)と関連した応答;虚血性再灌流;成人呼吸促進症候群;皮膚炎;髄膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;リウマチ様関節炎、シェーグレン症候群、脈管炎のような自己免疫疾患;白血球漏出を含む疾患;中枢神経系(CNS)炎症性疾患;敗血症または傷害の二次的な多発性器官傷害症候群;アルコール性肝炎,細菌性肺炎,抗原抗体複

合併存在性疾患；胸膜炎，肺肺炎，脈管炎，肺炎，慢性気管支炎，気管支拡張症および膿胞性繊維症を含む肺の炎症；等を含む。好ましい用途は細菌性肺炎および潰瘍性結腸炎のような炎症性結腸疾患である。

ここで用いられているように、喘息、喘息性疾患、および気管支喘息なる語は、下気道の拡張と収縮が存在する肺の病気を示す。アトピー性喘息、およびアレルギー性喘息なる語は、下気道におけるIgE-介在性過敏症反応の現れである喘息を示し、例えば喘息症状をコントロールするために頻繁なまたは一定の、吸入によるまたは全身性のステロイドの使用が必要であるような、並みのまたはひどい慢性喘息を含む。好ましい用途はアレルギー性喘息である。

B. 本発明を実施するための方法

I. IL-8拮抗剤調製

本発明の方法は、好中球に対するIL-8の結合を阻害またはブロックすることが可能ないかなるIL-8拮抗剤を用いても実施可能である。好ましくはIL-8拮抗剤はIL-8に応じた好中球走化性を阻害でき、および/または好中球のIL-8介在性エラスターゼ放出を阻害できる。ここで用いられるのに適したIL-8拮抗剤は、抗IL-8抗体、IL-8結合ペプチドおよびIL-8とその受容体間の相互作用を妨害するまたはブロックすることが可能な非タンパク質性小分子を含む。IL-8拮抗剤候補は、好中球に対するIL-8の結合の阻害、IL-8介在性好中球走化性の阻害およびIL-8介在性好中球エラスターゼ放出の阻害を以下のように試験され得る。

1. 好中球に対するIL-8の結合の阻害

好ましくはIL-8拮抗剤候補は、IL-8拮抗剤治療を予定している患者のもののよう、同種の哺乳動物種の好中球に対するIL-8の結合を阻害する能力を試験される。一つの実施態様として、患者から得られた好中球が、IL-8拮抗剤候補を試験するために用いられ、それによって医師が特定の患者に対する最大の治療上の効力を持つ試薬を同定することができる。しかしながら、本発明はIL-8拮抗剤候補の治療上の可能性をアッセイするために、予定されている患者のもの以外の哺乳動物の種から得られた好中球を使用することもまた包含する。好中球は1.5%デキストランT500(Pharmacia, Sweden)において全血液を沈降し、Lymphocyte Separat

ion Medium(Organon Teknika,Durham,NC)上で上清を層状にし、製品の使用方法にしたがって遠心分離し、細胞沈殿物を回収し、そしてそれから細胞沈殿物を2または3サイクルの低張性溶解にかけることによって赤血球と単核細胞から分離されうる。代わりに、好中球は全血液サンプルをMono-Poly Resolving Medium(M-PRM)(Flow Laboratories,McLean,VA)に置き、販売主の使用法にしたがって好中球バンドを回収することによっても、赤血球および末梢血単核細胞から分離し得る。

同様に好中球に対するIL-8の結合を阻害するIL-8拮抗剤候補の能力を試験するために、予定されている患者のものと同一哺乳動物種由来のIL-8を用いることが好ましい。しかしながら、もしIL-8がIL-8拮抗剤候補を用いる試験のために選択された好中球に結合するのであれば、いかなる哺乳動物種由来のIL-8を用いても本発明の範囲に属する。好ましくは、試験のために用いられるIL-8と好中球は同種の哺乳動物種由来のものである。

IL-8は興味ある種由来の内皮細胞または活性化T細胞および単球からもin vitroで単離されうる。IL-8はGimbrone等,Science,246:1601(1989)の方法にしたがって内皮細胞から、またはLindley等,Proc.Natl.Acad.Sci.,85:9199(1988)の方法にしたがって活性化T細胞および単球から便利に集められ得る。

ヒトIL-8のアミノ酸配列のように(Walz等,Biochem.Biophys.Res.Comm.,149:755-761(1987);Yoshimura等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:9233-9237(1987);Van Damme等,J.Exp.Med.,167:1364-1376(1988);Gregory等,Biochem.Biophys.Res.Comm.,151:883-890(1988)に開示されている)、もし特定のIL-8種のアミノ酸配列が既知のものであれば、興味あるIL-8種はMerrifield,Science,232:342-347(1986)によって記述されている固相合成法を用いることによって化学的に合成され得る。この方法では、伸長しているポリペプチド鎖は通常C末端でポリスチレン樹脂のビーズのように不溶性の固体の支持体に共有結合でつなぎ留められており、適当にブロックされたアミノ酸と試薬が正しい配列に加えられる。これにより、ビーズの単純な濾過および洗浄によって望ましいIL-8産物の量的な回収が可能になる。

代わりに興味あるIL-8種は組換え法によっても生産される。組換えIL-8は望ま

しいIL-8をコードするDNAの単離または合成、適当な発現ベクター内でのIL-8コードDNAのクローニング、組換えベクターを用いた適した発現宿主細胞へのトランスフェクション、組換え宿主細胞の選択または検出、およびIL-8発現を許容す

るコンディションの下での組換え宿主細胞の成育とそれからのIL-8産物の回収によって得られ得る。好ましい実施態様としては、組換えヒトIL-8は、Hebert等, *J. Immunol.*, 145:3033-3040(1990)に記述されているように得られる。

商業的に入手可能なIL-8種もまたここでの使用に適している。例えば組換えヒトIL-8は、R&D Systems, Minneapolis, MN(1995年のカタログではカタログナンバー208-IL)から購入できる。

好中球に対するIL-8の結合をアッセイするいかなる方法であっても、IL-8拮抗剤候補を試験するために用いられうる。適したアッセイは好中球に対するIL-8の結合をIL-8拮抗剤候補の存在下と不存在下で測定する競合的結合アッセイを含む。IL-8結合は例えばラジオラベル、蛍光色素ラベル、酵素ラベル、スピンラベル等のようなラベルされたIL-8を用いて、またはラベルされた抗IL-8抗体を用いて便利に検出できる。典型的なIL-8競合的結合アッセイでは、好中球を様々な濃度のIL-8拮抗剤候補を含む適当なバッファー溶液に懸濁し、ラベルされたIL-8を細胞懸濁液に混ぜ、混合物を競合的な結合反応が平行に達するのに十分な一定時間IL-8が好中球に結合するのを許容するコンディションの下でインキュベートし、非結合ラベルIL-8を細胞懸濁液の遠心分離または濾過によって除去し、そして好中球に結合したラベルIL-8をラベルの検出、例えばラジオラベルに対するシンチレーションカウンター、色素生産性の基質の添加および色素生産性酵素ラベルに対する分光測光的アッセイ、蛍光色素ラベルに対するフロー活性化細胞ソーティング等により定量する。

好ましい実施態様では、IL-8拮抗剤候補は以下の実施例に記述されているようにヒト好中球に対するヒトIL-8の結合の阻害をスクリーニングされる。

IL-8拮抗剤候補の特定の濃度でのIL-8結合阻害のパーセンテージは、試薬の存在下での好中球に対するラベルIL-8の特異的な結合の量を、試薬の不存在下での

好中球に対するラベルIL-8の特異的な結合のトータルの量で割ったもので形成される商を用いて計算し得る。ラベルIL-8の特異的な結合の量は、ラベルIL-8の結合のトータルの量からラベル非特異的な結合の量を差し引くことによって決定され得る。ラベルIL-8の非特異的な結合の量は、非ラベルIL-8の過剰量の存在下でラベルIL-8の特異的な結合を測定することによって決定され得る。IL-8結合の50%阻害に対して必要とされるIL-8拮抗剤候補の濃度(IC_{50})は、試験される様々な濃

度の試薬に対する阻害のパーセンテージを用いて測定される。

もし、約0.5nMのIL-8濃度の存在下で試薬の濃度が約100ナノモル/リットル(nM)またはそれ以下、好ましくは1nMまたはそれ以下、およびより好ましくは10ピコモル/リットル(pM)またはそれ以下で、試薬の不存在下で同じIL-8濃度を含むコントロールサンプルと比較して、減少した好中球に対するIL-8の結合を生じた場合には、その試薬は好中球に対するIL-8の結合を阻害することについてポジティブとして記録される。好ましくはIL-8拮抗剤候補は、約0.5nMの濃度のヒトIL-8の存在下で、約50nMまたはそれ以下の IC_{50} で、好ましくは約7.5nMまたはそれ以下の平均 IC_{50} で、より好ましくは約1.6nMまたはそれ以下の平均 IC_{50} でヒト好中球に対するヒトIL-8の結合を阻害することが可能である。

2. IL-8介在性好中球走化性の阻害

好ましくはIL-8拮抗剤候補はまた、IL-8に応じた好中球走化性を阻害する能力に対する試験もなされる。IL-8拮抗剤治療を予定されている患者のもののように同じ哺乳動物種由来の好中球のIL-8介在性走化性を阻害する能力のためIL-8拮抗剤候補を試験することが望ましい。一つの実施態様として、患者から得られた好中球がIL-8拮抗剤候補を試験するのに用いられ、それによって医師が特定の患者に対する最大の治療上の効力を持つ試薬を同定することができる。しかしながら、本発明はIL-8拮抗剤候補の治療上の可能性をアッセイするために、予定されている患者のもの以外の哺乳動物の種から得られた好中球を使用することもまた包含する。

同様にIL-8介在性好中球走化性を阻害するIL-8拮抗剤の候補の能力を試験する

ために、予定されている患者のものと同一哺乳動物種由来のIL-8を用いることが好ましい。しかしながら、もしIL-8がIL-8拮抗剤候補を用いる試験のために選択された好中球の走化性を導き出すのであれば、いかなる哺乳動物種由来のIL-8を用いても本発明の範囲に属する。好ましくは、試験のために用いられるIL-8と好中球は同種の哺乳動物種由来のものである。

一つの面として、IL-8拮抗剤候補は、中の各ウェルを5ミクロンフィルターで二つのチェンバーに水平に分割した96穴マイクロタイター走化性装置 (Neuro Probe, Cabin John, Maryland) を用いて、IL-8介在性好中球走化性の阻害を試験される。望

ましいIL-8のサンプルを上記セクション1に記述されたように得て、IL-8拮抗剤候補の特定の濃度のものと組み合わせ、それから走化性装置の下段のチェンバーに置く。望ましい好中球サンプルを上述のセクション1に記述したように得て、細胞を蛍光色素カルセインAM (Molecular Probe, Eugene, OR) を用いてラベルする。細胞を洗い、適当なバッファーに再懸濁し、走化性装置の上段のチェンバーに数えて置く。接しているチェンバー内に好中球が移動するのを導き出すのに十分な一定時間、IL-8が好中球装填(上段)チェンバー内で拡散するのを許容するコンディションの下で走化性装置をインキュベートする。インキュベーションの後、好中球装填(上段)チェンバー内に残っている細胞を吸引によって取り除き、上段チェンバー側のフィルターを洗い非移動細胞を取り除くために削ぎ落とす。それから下段チェンバーと下段チェンバー側のフィルターに存在するラベル好中球を分析のため定量する。

好ましい実施態様では、IL-8拮抗剤候補は以下の実施例に記述されているようにヒトIL-8に応じたヒト好中球移動の阻害のためアッセイされる。

IL-8拮抗剤を含むサンプル内の移動および非移動好中球の相対数は、IL-8単独を含むサンプル内で検出されるシグナル(非阻害IL-8に誘発される移動のためポジティブコントロールを提供する)と、バッファー単独を含むサンプル内で検出されるシグナル(バックグラウンド移動のためネガティブコントロールを提供する)を用いたIL-8拮抗剤サンプル内で検出されるシグナルの比較により測定され得る

。もし、約2nMの初めのIL-8濃度の存在下で試薬の濃度が約100nMまたはそれ以下、好ましくは1nMまたはそれ以下、およびより好ましくは10ピコモル/リットル(pM)またはそれ以下で、試薬の不存在下で同じIL-8濃度を含むコントロールサンプルと比較して、減少した好中球移動を生じた場合には、その試薬はIL-8介在性好中球移動を阻害することについてポジティブとして記録される。好ましくはIL-8拮抗剤候補は、約4nMの初めの濃度のヒトIL-8の存在下で、約6.0nMまたはそれ以下の濃度で、より好ましくは約3.0nMまたはそれ以下の濃度でヒト好中球移動の50%を阻害する。

3. IL-8介在性好中球エラスターゼ放出の阻害

好ましくはIL-8拮抗剤候補は、IL-8拮抗剤治療を予定している患者のもののように、同種の哺乳動物種由来の好中球のIL-8介在性エラスターゼ放出を阻害する能力をさらに試験される。一つの実施態様として、患者から得られた好中球が、IL-8拮抗剤候補を試験するために用いられ、それによって医師が特定の患者に対する最大の治療上の効力を持つ試薬を同定することができる。しかしながら、本発明はIL-8拮抗剤候補の治療上の可能性をアッセイするために、予定されている患者のもの以外の哺乳動物の種から得られた好中球を使用することもまた包含する。

同様にIL-8介在性好中球エラスターゼ放出を阻害するIL-8拮抗剤の候補の能力を試験するために、予定されている患者のものと同一哺乳動物種由来のIL-8を用いることが好ましい。しかしながら、もしIL-8がIL-8拮抗剤候補を用いる試験のために選択された好中球におけるエラスターゼ放出を誘発するのであれば、いかなる哺乳動物種由来のIL-8を用いても本発明の範囲に属する。好ましくは、試験のために用いられるIL-8と好中球は同種の哺乳動物種由来のものである。

非刺激化好中球では、IL-8はアズール顆粒の放出を引き起こさない。サイトカラシンBの存在下では、IL-8はアズール顆粒の脱顆粒およびエラスターゼの放出を引き起こす。それゆえIL-8に応答した好中球エラスターゼ放出を阻害するIL-8拮抗剤候補の能力は、上述のセクション1に記述されたように望ましい好中球およびIL-8を得て、サイトカラシンBと共に懸濁液中の好中球をインキュベートし

、IL-8拮抗剤候補の存在下および不存在下においてIL-8と共にサイトカラシンBで満たされた好中球をインキュベートし、細胞を取り除くため細胞懸濁液を遠心分離し、エラスターゼ基質たるメトキシスクシニル-アラニル-アラニル-プロリル-バリル-p-ニトロアニリドと共に細胞フリー上清をインキュベートし、そして405ナノメートル(nm)の波長で分光測光法的分析によって、試験サンプル内のp-ニトロアニリンの存在を検出することによって測定されうる。

好ましい実施態様では、IL-8拮抗剤候補は以下の実施例に記述されているようにヒトIL-8に応答したヒト好中球エラスターゼ放出の阻害によりアッセイされる。

特定の濃度のIL-8拮抗剤候補のIL-8介在性好中球エラスターゼ放出の阻害パーセンテージは、IL-8拮抗剤候補で処理されたサンプルの上清において検出される405nmの蛍光を、IL-8で処理されたコントロールサンプルの上清において検出される405nmの蛍光で割ることにより形成される商を用いて計算され得る。もし、約1

00nMのIL-8濃度の存在下で試薬の濃度が約10マイクロモル/リットル(μ M)またはそれ以下、好ましくは100nMまたはそれ以下、およびより好ましくは1nMまたはそれ以下で、試薬の不存在下で同じIL-8濃度を含むコントロールサンプルと比較して、減少した好中球エラスターゼ放出を生じた場合には、その試薬はIL-8介在性好中球エラスターゼ放出を阻害することについてポジティブとして記録される。好ましくはIL-8拮抗剤候補は、IL-8拮抗剤候補:ヒトIL-8のモル比が約1.0またはそれ以下、およびより好ましくは約0.65またはそれ以下で、ヒトIL-8によって誘発されるヒト好中球エラスターゼ放出の50%を阻害する。

II. 抗IL-8抗体調製

1. モノクローナル抗体

本発明の抗IL-8抗体は、好ましくは約 1×10^{-8} から 1×10^{-11} 、より好ましくは 1×10^{-9} から 1×10^{-10} の解離定数(K_d)でIL-8に結合するモノクローナルである。本発明の抗体は好ましくは、C5a、血小板第4因子または β -TGのようなIL-8以外のケモカインと固相酵素免疫検定法(ELISA)において測定可能な程度に結合するも

のではない。さらに本発明の抗体は好ましくは、IL-8で刺激される好中球からのエラスターゼ放出を阻害し、IL-8で刺激される好中球の走化性を阻害する。本発明の一つの実施態様として、本発明の抗体は、ウサギIL-8のようにヒトIL-8に加えて非ヒト種由来のIL-8に結合し得る。

本発明のもう一つの実施態様として、本発明の抗IL-8抗体のFab, Fab', Fab'-SHまたはF(ab')₂断片が作られる。これらの抗体断片は、酵素的切断のように伝統的な手段によって作り出すことができ、または組換え法によって生産されるであろう。該抗体断片はキメラまたはヒト化されたものであろう。これらの断片は以下に示すように診断上のまたは治療上の目的のために有用である。

本発明の抗IL-8モノクローナル抗体は例えば、KohlerとMilstein, Nature 256: 495(1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法を用いて作り出すことが可能であり、または組換えDNA法(Cabilly等, 上記参照)によって作り出され得る。

ハイブリドーマ法では、マウスや他の適当な宿主動物、ハムスターのようなものが、免疫化に用いられたIL-8またはIL-8断片に特異的に結合するであろう抗体を生産するまたは生産を可能にするリンパ球を導き出すために上述のように免

疫化される。IL-8に対する抗体は一般的に、IL-8およびアジュバントの複数回の皮下注射(sc)または腹膜内注射(ip)によって動物において生じる。動物は普通は、一リン酸化リピドA(MPL)/トレハロースジコリノミコレート(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)と共にIL-8の免疫原性複合物または誘導体に対して免疫化され、溶液は複数の部位に皮内で注射される。二週間後動物は抗体を作る。7から14日後動物から血を採り、抗IL-8力価について血清をアッセイする。力価が安定水準に達するまで動物に抗体を作らせる。

代わりに、リンパ球をin vitroで免疫化しうる。それからハイブリドーマ細胞を形成するためにポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いて、リンパ球をミエローマ細胞と融合する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice pp. 59-103(Academic Press, 1986))。

それゆえハイブリドーマ細胞は、非融合の元となるミエローマ細胞の成育と生

存を阻害する一つかそれ以上の物質を好ましくは含む適当な培地において、接種されそして成育される。例えばもし元となるミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠失していたならば、ハイブリドーマに対する培地は典型的には、HGPRT欠失細胞の成長を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(HAT培地)を含むであろう。

好ましいミエローマ細胞は効率よく融合し、選択された抗体生産細胞による抗体の安定な高レベルの生産を維持し、そしてHAT培地のような培地に感受性なものである。これらの中から好ましいミエローマ細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11由来のもののようなネズミミエローマ系、およびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2細胞である。

ハイブリドーマ細胞が成育している培地は、IL-8に対して向けられるモノクローナル抗体の生産のためアッセイされる。好ましくはハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法によって、または放射性免疫検定法(RIA)あるいは固相酵素免疫検定法(ELISA)のようなin vitro結合アッセイによって測定される。

mAbの結合アフィニティーは、例えばMunsonとPollard, Anal. Biochem. 107:220

(1980)のスキヤッチャード分析によって測定される。

ハイブリドーマ細胞が望ましい特異性、アフィニティーおよび/または活性の抗体を生産することを同定された後、該クローンを限界希釈法によってサブクローン化し、標準的な方法(Goding, 上記参照)によって成育させる。この目的のために適当な培地は、例えばD-MEMまたはRPMI-1640培地である。加えてハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍のようにin vivoで成育させることもできる。

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィーのようなありきたりの免疫グロブリン精

製法によって、培地、腹水分泌液または血清から適当に分離される。

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、ありきたりの方法を用いて容易に単離されシークエンスされる(例えばネズミ抗体のH鎖とL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)。本発明のハイブリドーマ細胞は上記DNAの好ましいソースとしても役に立つ。一度単離されると、DNAを発現ベクターにつなぎ、それからそれを組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るために、大腸菌、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはさもないと免疫グロブリンタンパク質を生産しないミエローマ細胞のような宿主細胞にトランスフェクトする。抗体をコードするDNAの細菌での組換え発現についてのレビュー論説は、Skerra等, Curr. Opin.

nion in Immunol.5:256(1993)およびPlückthun Immunol.Revs.130:151(1992)を含む。

DNAはまた、相同のネズミ配列の代わりにヒトH鎖およびL鎖定常ドメインのコード配列で置換することによって、あるいは非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列を免疫グロブリンコード配列に共有結合でつなぐことによって修飾し得る。上記方法では、ここでいう抗IL-8mAbの結合特異性をもつキメラ、またはハイブリッド抗体が調製される。

典型的には上記非免疫グロブリンポリペプチドは本発明の抗体の定常ドメインによって置換され、それらはIL-8に特異性を持つ一つの抗原結合部位と、異なる抗原に特異性をもつもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出すために、本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインで置換される。

キメラまたはハイブリッド抗体はまた架橋試薬を含むものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を用いてin vitroで調製されうる。例えば免疫毒素が、ジスルフィド交換反応を用いてまたはチオエーテル結合を形成することによって構築されうる。この目的のため適した試薬の例として、イミノチオレート及びメチル1-4-メルカプトブチリミデートが含まれる。

2. ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は本分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体は非ヒトであるソースからそれに導入された一つかそれ以上のアミノ酸残基をもつ。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート残基」として示され、典型的には「インポート」可変ドメインから由来している。ヒト化は本質的に、Winterと共同研究者(Jones等,Nature 321:522(1986);Riechmann等,Nature 332:323(1988);Verhoeyen等,Science 239:1534(1988))の方法にしたがって実施され、ネズミCDRまたはCDR配列を、相当するヒト抗体の配列で置換することによってなされる。したがって該「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり(Cabilly等,上記参照)、そこでは実質的に完全なヒト可変ドメインより短い部分が、相当する非ヒト種由来の配列で置換されている。実際問題として、ヒト化抗体は典型的には、いくつかのCDR残基および可能ないくつかのFR残基がネズミ抗体の相似性の部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

ヒト化抗体を作製する場合に用いられるL鎖とH鎖の両方のヒト可変領域の選択は、抗原性を減少する上で大変重要である。「ベスト-フィット」法と呼ばれる方法にしたがって、ネズミ抗体の可変ドメインの配列が既知のヒト可変ドメイン配列の完全なライブラリーからスクリーニングされる。それからネズミのものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためにヒトフレームワーク(FR)として受け入れられる(Sims等,J.Immunol,151:2296(1993);ChothiaとLesk,J.Mol.Biol.196:901(1987))。もう一つの方法は、L鎖とH鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを用いる。同様のフレームワークはいくつかの異なるヒト化抗体のためにも用いられ得る(Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:4285(1992);Presta等,J.Immunol.151:2623(1993))。

抗体は抗原に対する高アフィニティーおよび他の好ましい生物学的性質を保持したまま免疫化されることがさらに重要である。この目的を達成するため好ましい方法にしたがって、もととなるおよびヒト化配列の三次元モデルを用いてもととなる配列および様々な概念上のヒト化産物の分析の過程によって、ヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは、公に入手可能であり当業者には親しまれている。選択された免疫グロブリン配列の候補の可能な三次元構造を描写

し表示するコンピュータプログラムも入手可能である。これらの表示を見ることによって、免疫グロブリン配列の候補の機能において残基の考え得る役割の分析、すなわち抗原に結合する場合に免疫グロブリン候補の能力に影響する残基の解析が可能となる。この方法では、FR残基が、標的抗原(類)に対する増大したアフィニティーのような望ましい抗体特性を達成するためのコンセンサス配列およびインポート配列から選択され結合され得る。一般的にCDR残基は直接にそして最も実質的に抗原結合に影響する部位に含まれる。

3. ヒト抗体

ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマ法によって作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ細胞系及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系は、例えばKozbor, J. Immunol. 133:3001(1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); および Boerner等, J. Immunol. 147:86(1991)に記述されている。

免疫化により内因性の免疫グロブリン生産の不存在下でヒト抗体のフルレパートリーを生産することができるトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現代では可能である。例えば、キメラで生殖系列ミュータントマウスの抗体H鎖接合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体性欠失が、内因性抗体生産の完全な阻害を引き起こすことが記述されている。該生殖系列ミュータントマウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列のトランスファーは、抗原チャレンジによりヒト抗体の生産を引き起こすであろう。例えばJakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:2551(1993); Jakobovits等, Nature 362:255(1993); Bruggermann等, Year in Immuno. 7:33(1993)参照。

代わりに非ヒトドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリ

ーからin vitroでヒト抗体および抗体断片を生産するために、ファージディスプレイ法(McCafferty等, Nature 348:552(1990))を用いることができる。この方法では、抗体Vドメイン遺伝子がM13またはfdのような繊維状バクテリオファージの

メジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかのフレーム中にクローン化され、ファージ粒子の表面に機能的な抗体断片として展示される。繊維状粒子はファージゲノムのシングルスランドDNAコピーを含むので、抗体の機能的な性質に基づく選択はその性質を示す抗体をコードする遺伝子の選択という結果にもなる。それゆえファージは、B細胞の性質のいくつかを真似る。ファージディスプレイは様々な形式で実施されうる;それらのレビューについては、例えば Johnson等, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564(1993)を参照。V遺伝子配列のいくつかのソースがファージディスプレイ法に用いられうる。Clackson等, *Nature* 352:624(1991)は、免疫化マウスの脾臓由来のV遺伝子の小さなランダムな組み合わせのライブラリーから抗オキサゾロン抗体の様々な配列を単離した。非免疫化ヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーが構築され得、抗原(自己抗原を含む)の様々な配列に対する抗体が本質的に Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581(1991)、または Griffith等, *EMBO J.* 12:725(1993)に記述された方法にしたがって単離されうる。

天然の免疫応答では、抗体遺伝子は高い割合でミューテーションを蓄積する(体細胞超突然変異)。導入されたいくつかの変化は高アフィニティーを示し、抗アフィニティー表面免疫グロブリンを展示しているB細胞が好ましくは後の抗原チャレンジの間反復生産され分化される。この天然の過程はチェーンシャッフリングとして知られている方法を用いて真似し得る(Marks等, *Bio/Technol.* 10:779(1992))。この方法では、ファージディスプレイにより得られた一次のヒト抗体のアフィニティーが、非免疫化ドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然に起こり得る変異体のレパートリーを用いた、H鎖とL鎖のV領域遺伝子の連続的な置き換えによって改良され得る。この方法はnMの範囲でのアフィニティーを持つ抗体および抗体断片の生産が可能となる。大変大きなファージ抗体レパートリーを作製するストラテジーは、Waterhouse等, *Nucl. Acids Res.* 21:2265(1993)に記述されている。

遺伝子シャッフリングもまたネズミ抗体からヒト抗体を由来させるのに用いられ、そこではヒト抗体がスタート時のネズミ抗体と同じアフィニティーおよび特

異性をもつ。エピトープインプリンティング²⁾とも呼ばれるこの方法にしたがって、ファージディスプレイ法によって得られたネズミ抗体のH鎖およびL鎖Vドメイン遺伝子は、ネズミ-ヒトキメラを作製するために、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーを用いて置換される。すなわちエピトープがパートナーの選択を決定する(インプリントする)。残ったネズミVドメインを置換するために本過程が繰り返されると、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日に印刷されたPCT WO 93/06213参照)。CDR接合による伝統的なネズミ抗体のヒト化と異なり、この方法はネズミ起源のフレームワークまたはCDR残基を含まないヒト抗体を完全に提供する。

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体とは、少なくとも二つの異なる抗原に対する結合特異性を持つモノクローナルで、好ましくはヒトのまたはヒト化された抗体である。本ケースでは、IL-8および好中球の因子、または二つの異なるタイプのIL-8ポリペプチドを特異的に結合する二重特異性抗体が本発明の範囲にある。

二重特異性抗体を作成する方法は本分野で知られている。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの免疫グロブリンH鎖-L鎖ペアの共同発現に基づいており、そこでは二つのH鎖は異なる特異性をもつ(MilsteinとCuello, Nature 305:537(1983))。免疫グロブリンH鎖とL鎖のランダムな識別のため、これらのハイブリドーマ(クアッドローマ)は10種類の異なる抗体分子の混合物を潜在的に生産し、その中の一種だけが正しい二重特異性抗体なのである。正しい分子の精製は、通常アフィニティークロマトグラフィーステップによりなされるが、むしろ煩わしく、生産性は低い。同様の方法は1993年5月13日に印刷されたWO 93/08829およびTraunecker等, EMBO J. 10:3655(1991)に記述されている。

異なるそしてより好ましいアプローチにしたがうと、望ましい結合特異性を持つ抗体可変ドメイン(抗体抗原結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。好ましくは融合は、少なくともヒンジ部、第二のH鎖定常領域(C_H2)、および第三のH鎖定常領域(C_H3)を含む免疫グロブリンH鎖定常領域となされる。L鎖との結合に必要な部位を含む第一のH鎖定常領域(C_H1)を融合物の少なくとも一つに存在させるのも好ましい。免疫グロブリンH鎖融合物をコードするDNAおよび必要であれば免疫グロブリンL鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに組み込

み、適した宿主生物内に共同してトランスフェクトする。構築に用いられる非等量割合の三つのポリペプチド鎖が最適条件収率を提供すると、これにより実施態様における三つのポリペプチド断片の相互の性質を調製する大きな柔軟性が提供される。しかしながら、等量割合で少なくとも二つのポリペプチド鎖の生産が高い収率を引き起こした場合、またはその割合が特定の重要性を持たない場合、一つの発現ベクターに二つまたは三つ全てのポリペプチド鎖をコードする配列を組み込むことが可能である。このアプローチの好ましい実施態様によると、二重特異性抗体は一つの腕の第一の結合特異性を持つハイブリッド免疫グロブリンH鎖と、もう一方の腕のハイブリッド免疫グロブリンH鎖-L鎖ペア(第二の結合特異性を提供する)より成る。この非対称の構造は、二重特異性分子の半分だけを占める免疫グロブリンL鎖の存在が選別の容易な方法を提供するように、望まない免疫グロブリン鎖の組み合わせから望ましい二重特異性化合物を選別するのを容易にする。二重特異性抗体のさらに詳細を生産する方法については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology* 121:210(1986)を参照。

5. ヘテロ接合抗体

ヘテロ接合抗体もまた本発明の範囲にある。ヘテロ接合抗体は二つの共有結合で結合された抗体より成る。該抗体は例えば、望まない細胞に対して免疫系細胞の標的にするため(米国特許第4,676,980号)またはHIV感染の治療のため(WO 91/00360; WO 92/00373;そしてEP 03089)提案されている。ヘテロ接合抗体はいかなる便利な架橋法を用いてでも作製されうる。適した架橋試薬は本分野でよく知られており、たくさんの架橋法と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

III. 抗IL-8抗体の診断における使用法

IL-8の検出または定量を必要とする診断への応用のため、本発明の抗体は典型的には検出可能な部分を用いてラベルされるであろう。検出可能な部分は直接または間接に検出可能なシグナルを生ずることが可能ないかなるものでもあり得る。例えば検出可能な部分は、 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S または ^{125}I のようなラジオアイソトープ;フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリンのような蛍光化合物または化学ルミネセンス化合物;例えば ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C または ^3H のよう

な放射性のあるアイソトープラベル;アルカリホスファターゼ、ペーター-ガラクトシダーゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼのような酵素が挙げられる。

検出可能な部分と抗体を別々に接合するための本分野で既知の方法も用いることができ、それにはHunter等,Nature 144:945(1962);David等,Biochemistry 13:1014(1974);Pain等,J.Immunol.Meth.40:219(1981);およびNygren,J.Histochem.and Cytochem.30:407(1982)に記述された方法を含む。

本発明の抗体は、競合的結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、そして免疫沈降アッセイのようないかなる既知のアッセイ法でも用いられ得る。例えば、Zola,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,pp.147-158(CRC Press,Inc.,1987)参照。

競合的結合アッセイは、限られた量の抗体と結合するテストサンプル分析物(IL-8)と競合するラベルされたスタンダード(それはIL-8またはその免疫学的反応部分であり得る)の能力を当てにしている。テストサンプル中のIL-8の量は、抗体と結合するようになるスタンダードの量と逆につりあっている。結合するようになるスタンダードの量の測定を容易にするために、抗体は一般的に競合の前後で不溶化され、それによって抗体と結合したスタンダードと分析物を結合していないままのスタンダードと分析物から簡便に分離できる。

サンドイッチアッセイは検出すべきタンパク質(IL-8)の異なる抗原部位またはエピトープに対して各々結合できる二つの抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイでは、テストサンプル分析物が固体の支持体に固定されている第一の抗体に結合され、その後第二の抗体が分析物に結合し、それゆえ三つの部分からなる不溶性の複合体を形成する(米国特許第4,376,110号)。第二の抗体はそれ自体検出可能な部分でラベルされている(直接サンドイッチアッセイ)かまたは検出可能な部分でラベルされている抗免疫グロブリン抗体を用いて測定される(間接サンドイッチアッセイ)。例えばサンドイッチアッセイの一つのタイプがELISAであり、その場合には検出可能な部分は酵素(セイヨウワサビペルオキシダーゼ)である。

IL-8はまた組換え細胞カルチャーまたは天然由来のものからのIL-8のアフィニティー精製にも有用である。例えばカルチャー上清または組織のようなソースからIL-8を精製するために、これらの抗体を本分野でよく知られた技術によって固

体の支持体に固定することができる。

IV. IL-8拮抗剤の治療上の構成および投与

IL-8の治療上の処方は、凍結乾燥した塊または水溶液の形態で、任意の生理学的に許容できるキャリアー、賦形剤または安定剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 上記参照) と共に望ましい純度を持つIL-8拮抗剤による貯蔵から調製される。許容できるキャリアー、賦形剤または安定剤は、用いられる投与量と濃度で受容者に対して非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸のようなバッファー; アスコルビン酸を含む酸化防止剤; 低分子量 (約10酸基より小さい) ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質; ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンのようなアミノ酸; 単糖類、二糖類およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物; EDTAのようなキレート試薬; マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール; ナトリウムのような塩を形成しているカウンターイオン; および/または Tween、Pluronic またはポリエチレングリコール (PEG) のような非イオン性界面活性剤を含む。

in vivo の投与に用いられるIL-8拮抗剤は、滅菌されていなければならない。これは、凍結乾燥および水を加えて元に戻す操作の前または引き続いて、滅菌濾過メンブレンを通した濾過により容易に成し遂げられる。IL-8拮抗剤は通常は凍結乾燥した形態または水溶液で貯蔵されるであろう。

治療上のIL-8拮抗剤構成は一般的に、例えば皮下注射針で貫けるストッパーを持つ静脈注射溶液バッグまたはバイアルのような、滅菌アクセスポートをもつ容器内に置かれる。

IL-8拮抗剤投与の経路は、例えば静脈内、腹膜内、大脳内、筋肉内、眼球内、動脈内または病変内の経路による、浣腸または坐薬によるまたは持続放出システムによる吸入、注射または点滴のような既知の方法に調和している。

一つの実施態様として、本発明はIL-8拮抗剤の気道への投与による喘息性疾患の治療を提供する。本発明は、製薬学的構成および治療上の処方の気道への輸送のためにデザインされた広範囲の手段における使用のためのIL-8拮抗剤を含む処

方を企図している。本発明の一つの面として、IL-8拮抗剤はエアロゾル化または吸入形態で投与される。分散試薬または分散剤と結合したIL-8拮抗剤は、ドライパウダーとしてエアロゾル処方で、または希釈液を用いた溶液や懸濁液で投与され得る。

適した分散試薬は本分野でよく知られており、界面活性剤およびそれに類似するものを限定することなく含む。界面活性剤は一般的に、液体エアロゾルを形成する溶液の霧状化によって生ずるタンパク質の凝集を誘発する表面を減少するために本分野で用いられる。該界面活性剤の例として、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル及びアルコール、そしてポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルが含まれる。用いられる界面活性剤の量は変化し、一般的に処方の重さの約0.001から4%の範囲にあるであろう。特徴的な面として、界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートまたはソルビタントリオレエートである。

液体エアロゾル処方は、生理学的に許容できる希釈液中のIL-8拮抗剤および分散試薬を含む。本発明のドライパウダーエアロゾル処方は、IL-8拮抗剤の細かく分割された固体の形態および分散試薬、そして任意にパウダーの散布を容易にするための、ラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールおよびそれらの類似体のような膨張試薬より成る。液体であれドライパウダーエアロゾル処方であれ、処方はエアロゾル化されなければならない。つまりそれは、エアロゾル化した投与が実際に気管支及び/または肺胞のような望ましい場所に届くことを確立するために、液体または固体の粒子に細分化されなければならないということを示す。例えば、ここで提供される喘息の治療法においては、エアロゾル化したIL-8拮抗剤を気管支に運ぶことが望ましい。成人性呼吸促進症候群を治療するための本方法のような他の実施態様では、エアロゾル化したIL-8拮抗剤を肺胞に運ぶことが望ましい。一般的に、絶えず変化する粒子の平均の直径は、薬剤粒子が肺気管支または肺胞に届くことを確立するために、5マイクロメートル(μ m)またはそれより小さいであろう(Wearley, L.L., 1991, 1991, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8:333)。

デリバリー装置の構造に関しては、液体処方のネブライザー、アトマイザーま

たはポンプエアロゾル、そしてドライパウダー処方エアロゾルを限定することなく含む、本分野で既知のエアロゾル化のいかなる形態も本発明を実施する上で用いられ得る。固体処方の投与のため独特にデザインされたデリバリー装置が構想されている。しばしば、液体またはドライパウダー処方のエアロゾル化は高圧

ガスを必要とするであろう。高圧ガスは本分野で一般的に用いられるいかなる高圧ガスをも含む得る。有用な高圧ガスの例として、クロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボンおよび、トリフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび1,1,1,2-テトラフルオロエタンを含む炭化水素、そしてそれらの組み合わせが含まれる。

本発明の好ましい面として、エアロゾル化のための装置は定量投与量吸入器である。定量投与量吸入器は投与されると、投与に依存した可変的な投与量よりむしろ特異的な投与量を提供する。該定量投与量吸入器は、液体でもドライパウダーエアロゾル処方でも用いられ得る。

加圧した定量投与量吸入器及びドライパウダー吸入器のようなエアロゾル装置のシステムは、Newman, S.P., *Aerosols and the Lung*, Clarke, S.W. と Davia, D. 編, pp.197-22に開示され、本発明と関連して用いられ得る。

持続放出システムも本発明の方法を実施する上で用いられうる。持続放出調製の適した例として、形作られた商品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルのような形態の半透膜のポリマーマトリックスを含む。持続放出マトリックスには、ポリエステルヒドロゲルポリラクチド(U.S. 3,773,919, EP 58,481)、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman等, *Biopolymers* 22: 547(1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(Langer等, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167(1981)およびLanger, *Chem. Tech.* 12:98(1982))、エチレンビニルアセテート(Langer等, 上記参照)またはポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988)が含まれる。持続放出IL-8拮抗剤構成はまた、リポソームに封入されたIL-8拮抗剤を含む。IL-8拮抗剤を含むリポソームはそれ自体が既知の方法によって調製される: DE 3,218,121; Epstein等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:3688(1985); Hwang

等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:4030(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本国特許出願83-118008; 米国特許第4,485,045号および第4,544,545号; そしてEP 102,324。普通はリポソームは脂質含有量が約30モルパーセントコレステロールより大きい、小さな(約200-800オングストローム)単層上のタイプであり、選択される割合は最適のIL-8拮抗剤治療のために調製される。

治療学的に用いられるIL-8拮抗剤の有効量とは、例えば治療の目的物、投与経路、そして患者の体調に依存するであろう。よって、セラピストは最適の治療上の効果を得る必要性から投与量を調節し、投与経路を修正することが必要であろう。典型的には臨床医は、投与量が望ましい効果を達成するのに到達するまでIL-8拮抗剤を投与するであろう。本治療の進行はありきたりのアッセイによって容易にモニターされる。

IL-8拮抗剤を用いた炎症性疾患または喘息性疾患の治療と予防においては、IL-8拮抗剤構成は適した医療の実施に一致した方式で処方され、投与されるであろう。この意味で考慮されるファクターは、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床上の体調、疾患の原因、IL-8拮抗剤の輸送部位、IL-8拮抗剤の特定のタイプ、投与方法、投与スケジュールおよび医療従業者に知られている他のファクターを含む。投与される抗体の治療上の有効量とは、上記考慮に左右され、急性または慢性呼吸病を治療すること及び炎症応答を減少することを含む疾患の予防、改善、治療に必要な最小量である。上記量は好ましくは、ホストに毒性であり、感染に対してホストをさらに有意に感受性にする量より低量である。

一般的な計画としては、投与量当たり非経口的に投与されるIL-8拮抗剤の初めの製薬学的な有効量は、一日当たり患者の体重当たり約0.1から50ミリグラム(mg/kg/日)の範囲にあり、用いられるIL-8拮抗剤の典型的な初めの範囲は0.3から20mg/kg/日であり、好ましくは0.3から15mg/kg/日であろう。

全身の投与で用いられる一つの実施態様として、初めの製薬学的な有効量は、約2から5mg/kg/日の範囲にあらう。

吸入による投与で用いられる本発明の方法にとっては、初めの製薬学的な有効量は抗体試薬では約1マイクログラム(μ g)/kg/日から100mg/kg/日の範囲にあり、小分子試薬では約1 μ g/kg/日から20mg/kg/日の範囲にあるであろう。

本発明はIL-8拮抗剤を用いた喘息の予防法と治療法の両方を提供する。IL-8拮抗剤を用いたアレルギー性喘息の予防的な治療の場合には、予想されるアレルゲンにさらす前またはアレルギー性喘息の発症前約24時間までに、患者に対して約0.1から10mg/kgの抗体試薬を投与することが望ましい。アレルギー性喘息を含む急性喘息の治療学上の治療の場合には、喘息の罹患の始まりに引き続いてできるだけ速やかに喘息の患者を治療することが望ましい。一つの実施態様として、

急性喘息の症状の発現では抗IL-8抗体試薬の約0.1から10mg/kgの投与によって徴候の始まった24時間以内に治療される。しかしながら本発明の方法は喘息性疾患の病因におけるいかなる時点でも徴候を改善するのに用いられ得ることが認められるであろう。加えて本発明の方法は、慢性喘息性疾患の徴候を緩和するのに用いられ得る。

しかしながら上記注意したように、IL-8拮抗剤の提案されている量は治療上の裁量に大きく従う。適した投与量とスケジュールを選択するのに鍵となるファクターは、上記指摘したように得られた結果である。

IL-8拮抗剤は問題となっている炎症性疾患または喘息性疾患を予防または治療するために目下用いられている一つかそれ以上の試薬と共に処方される必要はないがそれも任意に許される。例えばリウマチ性関節炎の場合には、抗体はグルココルチコステロイドと共に与えられうる。IL-8拮抗剤を用いて喘息性疾患を治療する場合には、気管支拡張薬、抗ヒスタミン薬、エピネフリンおよびそれらの類似薬のような喘息の治療に有用である一つかそれ以上の付加的な試薬とIL-8拮抗剤を共に投与することを企図している。上記他の試薬の有効量は処方に存在するIL-8拮抗剤の量、疾患または治療のタイプそして上記議論したような他のファクターに依存する。これらは一般的にこれまで用いられてきたのと同じ投与量で同じ投与経路で用いられるかまたはこれまで用いられてきた投与量の約1から99%で用いられる。

以下の実施例は証明として提供され、限定のためではない。明細書中の全ての引例の開示は参考としてここに明白に取り込まれる。

実施例

A. ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体の生産と特性

Balb/cマウスを10マイクログラム(μ g)の組換えヒトIL-8((Ser-IL-8)₇₂とユビキチンの融合物として生産された(Hebert等, J. Immunology 145:3033-3040(1990)); IL-8はPepro Tech, Inc., Rocky Hill, NJから商業的に入手可能である)のMPL/TDM(Ribi Immunochem. Research Inc., Hamilton, MT)で再懸濁したものをを用いて各後脚肉趾または腹膜内に免疫化し、同量のIL-8を用いて二度追加免疫をした。これらの実験では、IL-8なる語は特に断りがなければ(Ser-IL-8)₇₂を意味すること

を示す。10 μ gのIL-8の最後の追加免疫を融合の三日前に行った。脾臓細胞または膝窩のリンパ節細胞を、前述したように35%ポリエチレングリコールを用いてミエローマP3X63Ag8の非分泌クローンであるマウスミエローマP3X63Ag8U.1(ATCC CRL1597)と融合した。融合の10日後、ELISAによってIL-8に対するモノクローナル抗体の存在のためカルチャー上清をスクリーニングした。

ELISAは以下のように実施した。Nunc96穴イムノプレート(Flow Lab, McLean, VA)を4℃オーバーナイトでリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の2マイクログラム/ミリリットル(μ g/ml)のIL-8の50マイクロリットル(μ l)/ウェルを用いてコートした。残りの工程は室温で実施した。非特異的結合部位を1時間(hr)0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)を用いてブロックした。それからプレートを1時間、672の成育している元の融合ウェルからハイブリドーマカルチャー上清の50 μ l/ウェルと共にインキュベートし、引き続き1時間アルカリホスファターゼ接合ヤギ抗マウスIg(Tago Co., Foster City, CA)の1ミリグラム/ミリリットル(mg/ml)ストック溶液の1:1000希釈液の50 μ l/ウェルを用いてインキュベートした。プレートに結合した酵素接合抗体のレベルをpH9.6の炭酸水素ナトリウムバッファー中の0.5mg/mlの α -ニトロフェニルリン酸塩の100 μ l/ウェルを加えることによって測定した。色素反応をELISAプレートリーダー(Titertrek Multiscan, Flow Lab, McLean, VA)を用

いて405nmで測定した。各工程の間プレートを0.05%Tween20を含むPBSで3回洗った。

コントロール培地より4倍より多くIL-8の結合を促進したカルチャー上清をポジティブとして選択した。この基準にしたがって、672の成育している元の融合ウェルの16がポジティブであった(2%)。これらのポジティブハイブリドーマ細胞系を限界希釈法を用いて少なくとも二回クローン化した。

ポジティブハイブリドーマの7つをさらに以下のように特徴付けた。モノクローナル抗体のアイソタイプを、オーバーナイトでのIL-8を用いたNunc96穴イムノプレート(Flow Lab, McLean, VA)のコート、BSAでのブロッキング、カルチャー上清を用いたインキュベーション、引き続いてアイソタイプ特異的アルカリホスファターゼ接合ヤギ抗マウスIg(Fisher Biotech, Pittsburgh, PA)の所定量の添加によって測定した。プレートに結合した接合抗体のレベルを上述したようにr-ニトロフェニルリン酸塩の添加によって測定した。

試験された全てのモノクローナル抗体がIgG₁またはIgG₂免疫グロブリンアイソタイプのいずれかに属していた。これらのモノクローナル抗体を含む腹水分泌液は、ELISAにおいて最大の結合の50%を与える希釈因子の逆数によって測定されるように、10,000から100,000の範囲の抗体力価を持っていた。

これらのモノクローナル抗体が同じエピトープに結合するかどうかを評価するために、競合的結合アッセイを実施した。ビオチン化mAbと非ラベルmAbの割合を1:100で、ビオチン化mAb5.12.14の結合は同一源のmAbによって有意に阻害されたがmAb4.1.3によっては阻害されず、一方でビオチン化mAb4.1.3の結合はmAb4.1.3によって阻害されたがmAb5.12.14によっては阻害されなかった。モノクローナル抗体5.2.3はmAb4.1.3と同様に振る舞い、一方でモノクローナル抗体4.8と12.3.9はmAb5.12.14と同様であった。それゆえmAb4.1.3とmAb5.2.3は、モノクローナル抗体12.3.9、4.8そして5.12.14によって認識されるエピトープとは異なるエピトープ(類)に結合する。ニトロセルロースペーパーに固定化されたIL-8に対する抗体の反応性を評価するために、イムノドットプロット解析が実施された。コントロールマウスIgG抗体が認識しない一方で、7つ全ての抗体がペーパーに固定化さ

れたIL-8を認識した。

これらの抗体の可溶性 ^{125}I -IL-8を捕らえる能力をラジオイムノ沈降試験(RIP)により評価した。略記すると、トレサー ^{125}I -IL-8(4×10^4 カウントパー分(cpm))を室温で1時間0.5%BSAと0.05%Tween20を含むPBS(アッセイバッファー)の0.2ml中にモノクローナル抗IL-8抗体の様々な希釈溶液を用いてインキュベートした。所定濃度のヤギ抗マウスIg抗血清(Pel-Freez, Rogers, AR)の100mlを加えて、混合物を室温で1時間インキュベートした。4℃に保存された6%ポリエチレングリコール(分子量(M.W.)8000)の0.5ミリリットル(ml)を加えることにより免疫複合体が沈殿した。4℃で20分の2,000×重(g)の遠心分離の後、上清をアスピレーターで除去し、沈殿に残存している放射能をガンマカウンターで計測した。特異的な結合のパーセントは(予想されるcpm-バックグラウンドcpm)/(全cpm-バックグラウンドcpm)として計算された。モノクローナル抗体4.1.3、5.2.3、4.8、5.12.14そして12.3.9は ^{125}I -IL-8を大変効率よく捕らえたが、一方で抗体9.2.4および8.9.1はELISAプレーと上でコートされたIL-8には結合できるにもかかわらずRIPでは可溶性 ^{125}I -IL-8を捕らえることができなかった(表I)。

これらのモノクローナル抗体の解離定数を競合的結合RIPアッセイを用いて測定

した。略記すると様々な濃度の非ラベルIL-8による ^{125}I -IL-8(20,000-40,000cpm/アッセイ)に対する各抗体の結合の競合的な阻害を、上述したRIPによって測定した。各mAbの解離定数(アフィニティー)をVersaTerm-PROコンピュタープログラム(Synergy Software, Reading, PA)で提供されるようなスキッチャードプロット分析(Munson等, Anal. Biochem. 107:220(1980))を用いることによって測定した。これらのモノクローナル抗体(9.2.4. および8.9.1は除く)の解離定数(K_d)は 2×10^{-8} から 3×10^{-10} モル/リットル(M)の範囲である。 3×10^{-10} Mの K_d を持つモノクローナル抗体5.12.14が、試験した全てのモノクローナル抗体の中で最高アフィニティーを示した(表I)。

表 I . 抗 IL-8 モノクローナル抗体の特性

抗体	IL-8 への特異的結合%	$K_d(M)$	アイソタイプ	pI
4.1.3	58	2×10^{-9}	IgG ₁	4.3-6.1
5.2.3	34	2×10^{-8}	IgG ₁	5.2-5.6
9.2.4	1	-	IgG ₁	7.0-7.5
8.9.1	2	-	IgG ₁	6.8-7.6
4.8	62	3×10^{-8}	IgG _{2a}	6.1-7.1
5.12.14	98	3×10^{-8}	IgG _{2a}	6.2-7.4
12.3.9	86	2×10^{-8}	IgG _{2a}	6.5-7.1

これらのモノクローナル抗体の IL-8 活性を中和する能力を評価するために、様々な濃度のカルチャー上清及び精製したモノクローナル抗体の存在下でヒト好中球に結合する ^{125}I -IL-8 の量を測定した。好中球は Mono-Poly Resolving Medium (M-PRM) (Flow Lab. Inc., McLean, VA) を用いて調製した。略記すると、新鮮でヘパリンで凝血防止したヒト血液を、血液と培地の割合が 3.5:3.0 で M-PRM に流し、室温で 30 分 $300 \times g$ で遠心分離した。中間層に多く存在する好中球を集め、PBS で一度

洗った。上記調製では決まってライトギームザ染色法にしたがって 95% の好中球より多い量が含まれた。受容体結合アッセイが以下になされた。50 マイクロリットル (μl) の ^{125}I -IL-8 (5 ナノグラム/ミリリットル (ng/ml)) を室温で 30 分 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 内の 50 μl の非ラベル IL-8 (100 マイクログラム/ミリリットル ($\mu\text{g/ml}$)) またはモノクローナル抗体と共にインキュベートした。それから混合物を 37°C で 15 分 100 μl の好中球 (10^7 細胞/ ml) と共にインキュベートした。20% スクロースと 0.1% BSA を含む 0.4 ml の PBS に混合物を流し 15 分 $300 \times g$ で遠心分離することによって結合した ^{125}I -IL-8 を非結合物質から分離した。上清をアスピレーターで取り除き、ペレットと関連する放射能をガンマカウンターで計測した。

モノクローナル抗体4.1.3、5.2.3、4.8、5.12.14そして12.3.9はIL-8とmAbのモル比が1:25でヒト好中球に対するIL-8の結合を85%より多く阻害した。それとは反対に、モノクローナル抗体9.2.4および8.9.1はヒト好中球上のその受容体に対するIL-8の結合を促進するようにみえた。コントロールマウスIgGもまた好中球に対するIL-8の結合を促進したので、mAb9.2.4および8.9.1によるその受容体に対するIL-8結合の促進は非特異的なもののようである。それゆえモノクローナル抗体4.1.3、5.1.3、4.8、5.12.14そして12.3.9は、潜在的な中和モノクローナル抗体であり、一方でモノクローナル抗体8.9.1および9.2.4は非中和モノクローナル抗体である。

IL-8によって誘発される好中球走化性をブロックする抗IL-8抗体の能力は以下のように試験された。IL-8によって誘発される好中球走化性はボイデンチェンバー法を用いて測定された(Larsen等, Science 243:1464(1989))。0.1%BSAを含むRPMIに再懸濁された100 μ lのヒト好中球(10^6 細胞/ミリリットル(細胞/ml))を上部チェンバーに置き、モノクローナル抗体有りまたは無しで29 μ lのIL-8(20nM)を下部チェンバーに置いた。細胞を37℃で1時間インキュベートした。下部チェンバーに移動した好中球をライトギームザ染色で染色し、顕微鏡化で計測した(100 \times 倍率)。実験グループ当たりおよそ10の異なる場所を実験した。中和モノクローナル抗体5.12.14および4.1.3は、IL-8とmAbの比が1:10でIL-8の好中球走化性活性のほぼ70%をブロックした。各mAbの等電点電気泳動(IEF)パターンをFastゲルシステム(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いて精製した抗体をIEFポリアクリルアミドゲル(p

H3-9, Pharmacia)に乗せることによって測定した。サンプルを流す前にIEFゲルを1%TritonX100を含むファルマライトを用いて10分間前処理した。IEFパターンを製品の説明書にしたがって銀染色によって明視化した。全てのモノクローナル抗体が異なるIEFパターンをもち、それらが異なるクローンから生じたことが確認された。抗体のpI値は表 I に挙げられている。

これら全てのモノクローナル抗体がIL-8の(ala-IL-8)77および(ser-IL-8)72型の両方に等しくよく結合した。IL-8は β -TG(Van Damme等, Eur. J. Biochem. 181:33

7(1989);Tanaka等,FEB 236(2):467(1988))およびPF4(Deuel等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.74:2256(1977))のような、炎症性サイトカインの血小板第4因子(PF4)ファミリーの他のメンバーと30%より大きい配列ホモロジーをもつので、それらは β -TGおよびPF4との考え得る交差反応性のため試験され、同様にもう一つの好中球活性化因子C5aに対しても試験された。 β -TGに対してわずかな交差反応性を示したmAb4.1.3を除いて、これらのタンパク質のいずれに対しても検出可能な結合は観察されなかった。

抗体の中の一つmAb5.12.14は好中球によるIL-8介在性エラスターゼ放出をブロックするかどうかを測定するためさらに研究された。略記するとヒト好中球を1.0%BSA、フラクシオンV(Sigma,St Louis,MO)、2mg/mlアルファ-D-グルコース(Sigma)、4.2ミリモル/リットル(mM)炭酸水素ナトリウム(Sigma)および0.01M HEPES,pH7.1(JRH Bioscience,Lenexa,KS)を含むハンクス平衡塩類溶液(Gibco,Grand Island,NY)中に再懸濁した。サイトカラシンB(Sigma)のストックを調製し(ジメチルスルホキシド(Sigma)中に5mg/ml)、2-8℃で貯蔵した。最終濃度5 μ g/mlになるようにサイトカラシンBを好中球調製物に加え、37℃で15分インキュベートした。ヒトIL-8を37℃で30分1mlポリプロピレンチューブ(DBM Scientific,San Fernando,CA)中で、mAb5.12.14(20 μ l)またはネガティブコントロール抗体と共にインキュベートした。IL-8の最終アッセイ濃度は50および500nMであった。モノクローナル抗体を以下の割合(IL-8:Mab):1:50、1:10、1:2、1:1および1:0.25になるように希釈した。サイトカラシンBで処理した好中球を加え(100 μ l/チューブ)、25℃で2時間インキュベートした。チューブを10分間遠心分離し(210 \times g、2-8℃)、上清を96穴組織カルチャープレート(30 μ l/ウェル)に移した。DMSO中の10mMメトキシスクシニル-アラニル-アラニル-プロリル-バリル-p-ニトロアニリド(Calbiochem,La Jolla,CA)のエラスターゼ基質ストックを調製し、2-8℃で貯蔵した。エラスターゼ基質溶液(蒸留水中に1.2mM基質、1.2M NaCl(Mallinckrodt,Paris,Kentucky)、0.12M HEPES pH7.2)を上清に加え(170 μ l/ウェル)、37℃で0.5から2時間インキュベートした(1.0のコントロール光学濃度(O.D.)に到達するまで)。405nm

em,La Jolla,CA)のエラスターゼ基質ストックを調製し、2-8℃で貯蔵した。エラスターゼ基質溶液(蒸留水中に1.2mM基質、1.2M NaCl(Mallinckrodt,Paris,Kentucky)、0.12M HEPES pH7.2)を上清に加え(170 μ l/ウェル)、37℃で0.5から2時間インキュベートした(1.0のコントロール光学濃度(O.D.)に到達するまで)。405nm

で吸光度を測定した (SLT 340 ATTCプレートリーダー、SLT Lab Instruments, Austria)。

その結果は図1に示されている。IL-8とmAb5.12.14の比が1:1で、抗体は能率よく好中球からのエラストラーゼ放出をブロックできた。

抗体5.12.14を生産するハイブリドーマを1993年2月15日にAmerican Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA. (ATCC)に寄託し、ATCC登録番号HB 11553と指定された。本寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下になされた。

B. ウサギIL-8に対するモノクローナル抗体の生産と特性

ウサギIL-8に対する抗体を、免疫原としてウサギIL-8を用いて抗ヒトIL-8抗体と本質的に同様の工程で生産した (C. Broaddusにより丁寧に提供されている; Yoshimura等, J. Immunol. 146:3483 (1991)も参照)。ELISAプレート上にコートされた他のサイトカインに対する結合のため上記したように特徴付けた; MGSA, fMLP, C5a, b-TG, TNF, PF4またはIL-1に対する測定可能な結合は見出されなかった。

抗体6G4.2.5を生産するハイブリドーマを1994年9月28日にAmerican Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA. (ATCC)に寄託し、ATCC登録番号HB 11722と指定された。本寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下になされた。

5.12.14および6G4.2.5に対する組換えヒト-ネズミキメラFabを以下に記述するように構築した。キメラ6G4.2.5Fabはキメラ5.12.14Fabと以下に詳細に述べるように比較できる。

I. 5.12.14Fabおよび6G4.2.5Fabによるヒト好中球に対するIL-8結合の阻害

能率よくIL-8に結合しヒト好中球上のIL-8受容体に対するIL-8の結合を妨げる、5.12.14Fabおよび6G4.2.5Fabという二つのキメラFabの能力を、IL-8結合の50%阻

害を達成するのに必要な IC_{50} 濃度の計算を可能にする競合的結合アッセイを実施することによって測定した。

ヒト好中球 (5×10^5) を様々な濃度 (0から300nM) の5.12.14Fab、6G4.2.5Fab、ア

イソタイプコントロール(4D5-Fab)または非ラベルIL-8の存在下で、 $0.5\text{nM}^{125}\text{I}$ -IL-8と共に 4°C で1時間インキュベートした。インキュベーション後、非結合 ^{125}I -IL-8をリン酸緩衝生理食塩水中に20%スクロースと0.1%ウシ血清アルブミンの溶液を用いた遠心分離により除去し、細胞に結合した ^{125}I -IL-8の量をガンマカウンターで細胞沈殿物を計測することにより測定した。図2は非ラベルIL-8による好中球に対する ^{125}I -IL-8の結合の阻害を示す。図3はネガティブアイソタイプにマッチするFabはヒト好中球に対する ^{125}I -IL-8の結合を阻害しないことを示す。5.12.14Fab(図4)および6G4.2.5Fab(図5)の両抗IL-8Fabは、平均 IC_{50} がそれぞれ 1.6nM および 7.5nM でヒト好中球に対する ^{125}I -IL-8の結合を阻害できた。

11.5.12.14Fabおよび6G4.2.5FabによるIL-8介在性好中球走化性の阻害

ヒト好中球を単離し、計測して0.1%ウシ血清アルブミンを含むハンス平衡塩類溶液(HBSSと略記する;カルシウムとマグネシウムが含まれていない)に 5×10^6 細胞/mlになるように再懸濁した。好中球を最終濃度 $2.0\text{マイクロモル/リットル}(\mu\text{M})$ になるようにカルセインAM(Molecular Probe, Eugene, OR)を加えてラベルした。 37°C で30分引き続きインキュベートし、細胞をHBSS-BSAで二回洗い、 5×10^6 細胞/mlに再懸濁した。

走化性実験はNeuro Probe(Cabin John, MD)96穴チェンバー、モデルMBB96内で実施した。実験サンプル(バッファーのみのコントロール、IL-8単独またはIL-8+Fab)を下部チェンバーに置かれたPolyfiltronics96穴Viewプレート内に流した。AMラベル好中球の $100\mu\text{l}$ を上部チェンバーに加え、下部チェンバーサンプルに向かって5マイクロメートル孔を持つPVPフリーポリカルボネートで作られたフィルター(Neuro Probe Inc.)を通過して移動させるようにした。それから走化性装置を $5\%\text{CO}_2$ と共に 37°C で40から60分間インキュベートした。インキュベーションの最後に、上部チェンバーに残存している好中球をアスピレーターで吸い取り、上部チェンバーをPBSで3回洗った。それからポリカルボネートフィルターを取り外し、非移動細胞をPBSで湿らせたスキージで拭い去り、フィルターを15分間風乾させた。

フィルターを通して移動した好中球の相対数(好中球移動指数)は、フィルター

の蛍光強度および下部チェンバーの内容物の蛍光強度を測定し、二つの値を共に加えることによって決定された。蛍光強度は、感度セット3で485-20nmのエキサイテーションフィルターおよび530-25のエミッションフィルターを用いてCorning 96穴プレートを読むために形成されたCytoFluor2300蛍光プレートリーダー(Millipore Corp.Bedford,MA)を用いて測定された。

その結果が図6および図7に示されている。図6はキメラ6G4.2.5および5.12.14FabによるヒトIL-8介在性好中球走化性の阻害を示す。図7はウサギIL-8介在性好中球走化性を阻害するキメラ6G4.2.5および5.12.14Fabの相対的能力を示す。

III. 様々な濃度の6G4.2.5および5.12.14FabによるIL-8介在性好中球エラスターゼ放出の阻害

ヘパリンで凝血防止した注射器に男性のドナーから血液を採血した。デキストラン沈降、Lymphocyte Separation Medium(Organon Teknika,Durham,NC)での遠心分離そしてBerman等(J.Cell Biochem.52:183(1993))に記述されているように混入した赤血球の低張性溶解によって、好中球を単離した。最終好中球沈殿物を1.0%BSA(フラクションV,Sigma,St.Louis,MO)、2mg/mlグルコース、4.2mM炭酸水素ナトリウムそして0.01M HEPES,pH7.2を補ったハックス平衡塩類溶液(GIBCO,Grand Island,NY)より成るアッセイバッファーに、 1×10^7 細胞/mlの濃度に再懸濁した。好中球を1時間より長くない時間4℃で貯蔵した。

IL-8(10 μ l)を抗IL-8Fab、アイソタイプコントロールFabまたはバッファー(20 μ l)と共に1mlポリプロピレンチューブで混ぜ、30分37℃のウォーターバス内でインキュベートした。IL-8は投与量応答実験(図8)では0.01から1000nMの範囲の最終濃度で用い、エラスターゼ放出におけるFabの影響に向けられた実験(図9および10)では100nMの最終濃度で用いた。Fab濃度がおおよそ20nMから300nMの範囲で、Fab:IL-8のモル比が0.2:1から3:1となった。サイトカラシンB(Sigma)を濃度5 μ g/ml(DMSOで作られた5mg/mlのストック溶液を用いる)で好中球懸濁液に加え、細胞を37℃のウォーターバスで15分インキュベートした。それからサイトカラシンBで処理された好中球(100 μ l)をIL-8/Fab混合物に加えた。室温での3時間のインキュベーションの後、好中球を遠心分離(200 \times g、5分)によってペレット化し、細胞のな

い上清の部分標本を96穴プレート(30 μ l/ウェル)にトランスファーした。エラスターゼ基質たるメトキシスクシニル-アラニル-アラニル-プロリル-バリル-p-ニトロアニリド(Calbiochem, La Jolla, CA)を、DMSO内に10mMストック溶液として調製し、4℃貯蔵した。エラスターゼ基質作用溶液を使用する直前に調製し(1.2mM エラスターゼ基質、1.2M NaCl, 0.12M HEPES, pH7.2)そして170 μ lを各サンプルを含むウェルに加えた。プレートを37℃の組織カルチャーインキュベーター30分またはポジティブコントロールを読み取る光学濃度が少なくとも1.0に到達するまで置いた。SLT 340プレートリーダー(SLT Lab Instruments, Austria)を用いて405nmの吸光度を測定した。

図9はヒトIL-8によって刺激されたヒト好中球からのエラスターゼ放出を阻害するキメラ抗IL-8Fabの能力を示す;図10はウサギIL-8によって刺激されたヒト好中球からのエラスターゼ放出を阻害するキメラ抗IL-8Fabの相対的能力を示す。

C. 実験的結腸炎モデル

慢性実験的結腸炎の最も広く受け入れられているモデルの一つは、最近Morris等, *Gastroenterology* 96:795(1989)に記述された2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘発性傷害である。略記すると、50%エタノールの0.25ml中に10から30ミリグラム(mg)のTNBSの直腸投与により、結腸重量の投与量依存的増大、ひどい潰瘍そしてミエロペルオキシダーゼ値により証明される急性および慢性局所的炎症が生じる。エタノール中のTNBSの高投与量(30mg)により1週間で最高点に達するが投与後少なくとも8週間は持続する結腸傷害を生じる。結腸炎症は一週目で体重減を、1から3週間で動物の90%で下痢を伴い、そして近位の膨張と共に末端の結腸で狭窄を伴うが死亡率は3%のみである。慢性の状態では炎症は直線状の(横断的な)潰瘍と共に部分的であり、結腸が太くなることで特徴付けられる。経壁の急性および慢性炎症は、3から5週間で外筋および漿膜において炎症性細胞湿潤における進行性の増大と共に組織学的に注目される。粘膜のおよび漿膜の肉芽種は2から3週間で調べられた55%の動物で存在し、傷害の4週またはそれ以上ではおよそ20%の動物で存在する。

本発明の抗IL-8抗体のウサギにおける急性結腸炎を緩和する能力を研究するために、30%エタノール内の17-35mg/mlトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS/EtOH)

(Morris等, *Gastroenterology* 96:795(1989)の方法を翻案した)の5mlの結腸内点滴注入により、結腸炎をNew Zealand Whiteウサギ(1.8-2キログラムの体重)内に誘発した。五匹のウサギを5mg/kgの6G4.2.5を用いて静脈注射で処理した。三匹のコントロールウサギはPBSを受け取った。TNBS/EtOHで処理された動物は投与の24時間後安楽死させ、IL-8、ミエロペルオキシダーゼ(多形核白血球またはヘテロフィルの酵素マーカー)、湿った結腸重量、全炎症そして組織変化のレベルのため結腸組織を調べた。二つの結腸切片をありきたりのヘマトキシリンおよびエオシン切片のための標準的な方法によって加工したホルマリンで保存した。固相酵素免疫測定法により結腸組織のIL-8レベルを調べた。治療および非治療ウサギ由来の湿った結腸重量を測定し比較した。浮腫をサンプル当たり3から5部位の粘膜下組織の厚さとして測定した。どの組織切片内の血管に影響を及ぼかを測定することによって、白血球辺縁趨向を評価した(例えば表在性か、固有層内の上皮下血管のみを含むか、著しくは粘膜下組織内の血管を含むか)。壊死の範囲は明らかに壊死である結腸のパーセントとして測定した。壊死のひどさは結腸壁内への壊死の浸透の深さとして測定した。全炎症は含まれる結腸の長さ以上の炎症のひどさとして定義され、腫脹および配色の程度に基づいて視覚的に記録された。白血球浸透は高倍率の視野(HPF)(40×倍率)当たりの好中球数を数えることによって測定された。単核細胞浸透はHPF(40×倍率)当たりの単核細胞数を数えることによって測定された。

炎症を起こしているウサギ結腸組織内へのヘテロフィル(好中球)流入は、MPOレベルの測定によりモニターされた(例えばBradley等, *J. Invest. Dermatol.* 7B:206(1982)を参照)。略記すると結腸切片を15mlポリプロピレンチューブに置き、60℃で2時間インキュベートした。組織を液体窒素で凍らせた。細かい粉状の組織溶解物をモルタルと乳棒で調製し、15mlのポリプロピレンチューブ内に移した。組織ホモジェナイザーを用いて組織のグラム当たり3.5mlの割合で、0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(HTAB)(50mM KPO_4 バッファー、pH6内で0.5%の容量当たりの重さ(w/v))内に可溶化した。サンプルを二回液体窒素内で凍らせ、60度ウォーターバスで解凍した。それからサンプルを2.5パワーレベルで50%デュー

ティーサイクルで10秒間超音波処理にかけた。各サンプル溶解物をマイクロフュージチューブに移し、室温で15分15,600×gで遠心分離した。サンプルを新しく清潔なM

icrofugeチューブに移した。各サンプルの75 μ lおよびウェル当たり0.03ユニットに希釈したHTAB内のヒトMPOスタンダードポジティブコントロール(Calbiochem Corp., San Diego, CA)の75 μ lを、96穴フラットボトムプレートに三重に移した。HTAB(50mMKPO₄バッファー、pH6.0内に0.5%w/v)の75 μ lをブランクに参考として加えた。H₂O₂の100 μ lを各ウェルに加えた。96穴プレート内での反応をThermo Max光学プレートリーダー(Molecular Devices Co. Menlo Park, CA)上でモニターした。1.0ml蒸留水中の10mgドライパウダーでO-ジアニシジン(Sigma, St. Louis, MO)のストック溶液を調製し、0.2ミクロンフィルターに通した。25 μ lを各ウェルに加えた。プレートを30分以上3-5分間隔で連続的にOD450nmで読み取った。

ミエロペルオキシダーゼおよびIL-8の増大したレベルを偽の治療を受けたコントロール動物と比較してTNBS/EtOHの増大した投与量を用いて投与された動物内で検出した。増大した結腸重量と全炎症もまた明らかであった。組織学的評価により、侵されている組織の結腸壁の粘膜の壊死、血管のヘテロフィル辺縁趨向および浸透が明らかにされた。

しかしながら抗IL-8抗体を用いたウサギの治療により、TNBS/EtOH誘発性結腸炎のひどさは減少した。TNBS/EtOHを用いた結腸炎誘発の直前、体重のキログラム当たり5ミリグラムの(mg/kg)6G4.2.5の静脈注射で治療された動物内の病変は、3匹のコントロール動物と比較して5匹の動物のうち4匹で緩和した。抗体治療は壊死の範囲およびひどさ、全炎症、結腸重量、浮腫、ヘテロフィル辺縁趨向そして浸透を減少した。結腸ミエロペルオキシダーゼおよびIL-8のレベルは大きく減少した。これらの実験の結果が図11に示されている。これらの観察結果は結腸炎の緩和における抗IL-8抗体の有用性を支持する。

D. 細菌性肺炎における好中球移動に対する抗IL-8の効果

好中球は肺炎連鎖球菌による感染を含む様々な刺激に応答して肺に移動する。本発明の抗IL-8抗体が上記好中球移動を阻害し、それによって肺内の炎症を改善

できるかどうかを測定するために、ウサギ肺炎モデルを用いた。略記すると麻酔をかけられたNew Zealand Whiteウサギに全容量が0.5mlになるように抗ウサギIL-8抗体(6G4.2.5クローン)またはコントロールマウスIgG(最終濃度0.5mg/ml)のいずれかおよびコロイド状の炭素(5%)と組み合わせた、肺炎連鎖球菌、大腸菌、緑

膿菌(3×10^8 細胞/ml)を気管支内に点滴注入した。3時間50分後、肺の血液流量を測定するためにウサギにラジオリベルしたミクロスフェアの静脈注射を与えた。4時間で心臓および肺を摘出し、肺を分離した。コロイド状の炭素で示されているような肺炎部位(通常は左下葉)および反対側の肺内の相当する部位をリン酸緩衝生理食塩水を用いて洗浄した。洗浄液で血球計算機を用いて全白血球数を得、ライト染色サイトスピン調整を実施して異なる計測を為した。

抗ウサギIL-8抗体を用いての治療はアイソタイプコントロールマウスIgGを用いて治療された動物と比較してBAL液内に存在する好中球の数を有意に減少した(図12)。それゆえ抗IL-8抗体は肺炎の肺内の好中球移動を効果的に減少する。

E. ネズミ5.12.14(抗IL-8)モノクローナル抗体の様々なL鎖およびH鎖の分子的クローニング

ChomczynskiとSacchi(Anal.Biochem.162:156(1987))に記述された方法を用いて 1×10^8 細胞(ハイブリドーマ細胞系ATCCHB-11722)からRNAを単離した。カップL鎖およびIgG2aH鎖の定常領域(これらの領域のDNA配列はSequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E. A.等(1991)NIH Publication91-3242, V 1-3に印刷されている)をコードするネズミRNAの領域とハイブリダイズするようにデザインされた合成DNAオリゴヌクレオチドを用いてmRNAを特別に準備することによって第一ストランドcDNAを合成した。プライマーハイブリダイゼーションの機会と第一ストランドcDNA合成の効率を高めるために各L鎖およびH鎖のために三つのプライマーをデザインした(図13)。第一ストランドcDNAのダブルストランド(ds)DNAへの増幅は、二つのセットの合成DNAオリゴヌクレオチドプライマーを用いて達成される:L鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーおよび一つの逆のプライマー(図14)そしてH鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーおよび一つの逆のプライマー(図15)である。5.12.14のL鎖またはH鎖のいずれかの最初

の8アミノ酸のN末端配列を、この領域に相当する推定のネズミDNA配列を生じるために用いた(エドマン分解タンパク質配列決定法を用いてL鎖およびH鎖の両方のN末端から合計29アミノ酸をシーケンスした)。この情報を正の増幅プライマーをデザインするために用い、該プライマーは天然のネズミDNAコドンとのプライマーハイブリダイゼーションの機会を増大するためいくつかのコドンで第3番目の位置が縮重

して作られており、クローニングベクター内のSTII要素の3'末端へのライゲーションを容易にするためL鎖可変領域正プライマーおよびH鎖可変領域正プライマーの両方に対して独特の制限部位、Mlu Iをも含ませた。可変/定常接合部の近くでL鎖またはH鎖の定常領域の部分に相当するネズミDNA配列とアニールするように、逆の増幅プライマーをデザインした。ベクター、pB13.1(L鎖)およびpB14(H鎖)内でヒトIgG1定常L鎖またはIgG1定常H鎖のそれぞれの5'末端にライゲーションするため、L鎖可変領域逆プライマーは独特のBstB I 制限部位を含み、H鎖可変領域逆プライマーは独特のApa I 制限部位を含んだ。これらのプライマーのセットを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、およそ400bpのDNA断片を生じた。5.12.14L鎖可変領域をコードするcDNAをpA51214VLを形成するためにベクターpB13.1内にクローニングし、5.12.14H鎖可変領域をコードするcDNAをpA51214VHを形成するためにベクターpB14内にクローニングした。cDNA挿入物はDNAシーケンスにより特徴付けられ、図16(ネズミL鎖可変領域)内と図17(ネズミH鎖可変領域)に存在する。

F.5.12.14Fabベクターの構築

始めの構築物たるpA51214VLでは、5.12.14ネズミL鎖可変配列とヒトIgG1定常L鎖配列内の独特のクローニング部位BstB I の間のアミノ酸は、ネズミ定常部位の最初の13アミノ酸に相当するネズミ由来のものであった(図16)。それゆえこのプラスミドは5.12.14ネズミL鎖可変領域およびヒトL鎖IgG1定常領域を分離するネズミ定常領域の不必要な部分を含んでいた。この介在配列はキメラのアミノ酸配列を変え、誤ったフォールディングのFabをおそらく生産するであろう。A109の後ろのcDNAクローンを即座に切り詰めポリメラーゼ連鎖反応によって可変/定常

接合部にBstB I 部位を再配置することによって、この問題は解消された。図18はこれらの修正をなすために用いられた増幅プライマーを示す。正のプライマーVL.frontはMlu I クローニング部位を含むSTIIシグナル配列の最後の5アミノ酸および5.12.14ネズミL鎖可変配列の最初の4アミノ酸にマッチするようにデザインされた。その配列は後の構築に用いられる独特のEcoRV クローニング部位を作り出すために最初の二つのコドンD1(TをCに)および12(CをTに)の第三位置においてオリジナルのcDNAから変更された。逆のプライマーVL.rearはヒトIgG1定常L鎖配列の最初の3アミノ酸および独特のBstB I クローニング部位を含む5.12.14L鎖可変配列の最後

の7アミノ酸にマッチするようにデザインされた。BstB I 部位を加える工程において、いくつかのアミノ酸をコードする核酸配列を変更した:アルギニンへの保存的なアミノ酸置換を引き起こすL106(TTGをCTTに)、K107(AAAをCGAに)そしてR108(CGGをAGAに)。それから修正された5.12.14L鎖可変配列をコードするPCR産物を、二個所のライゲーションによりpB13.1内にサブクローン化した。Mlu I -Bst I で切断したL鎖可変領域をコードする5.12.14PCR産物をプラスミドpA51214VL'を形成するためにMlu I -BstB I で切断したベクターにライゲーションした。修正されたcDNAをDNAシーケンスにより特徴付けた。5.12.14L鎖のコード配列は図19に示されている。

同様にH鎖可変領域の最後とpA51214VHのヒトIgG1H鎖定常ドメイン内の独特のクローニング部位Apa I の間にあるDNA配列を、ネズミからヒトへこのエリア内のアミノ酸を換えることにより再構成した。これはポリメラーゼ連鎖反応によってなされた。ネズミ5.12.14H鎖可変配列の増幅は図18に示されたプライマーを用いて達成された。正のPCRプライマーをSTIIシグナル配列およびH鎖可変領域をコードする推定のcDNA配列の上流のpA51214VH内の核酸867-887にマッチするようにデザインし、Spe I という独特のクローニング部位を含ませた。逆のPCRプライマーを5.12.14H鎖可変配列の最後の4アミノ酸およびApa I という独特のクローニング部位もまた含むヒトIgG1H鎖定常配列に相当する最初の6アミノ酸にマッチするようにデザインした。それから修正された5.12.14H鎖可変配列をコードするPCR産

物を二箇所ライゲーションによって発現ベクターpMHM24.2.28にサブクローン化した。該ベクターはSpe I およびApa I を用いて切断され、Spe I -Apa I で切断されたH鎖可変領域をコードする5.12.14PCR産物をプラスミドpA51214VH'を形成するためにその中にライゲーションした。修正されたcDNAはDNAシーケンスで特徴付けられた。5.12.14H鎖のコード配列は図20に示されている。

キメラ5.12.14Fabをコードしている最初の発現ベクターpantiIL-8.1をEcoRV-Bpu I 1021断片を、pA51214VL'のネズミ5.12.14L鎖可変領域をコードするEcoRV-Bpu I 1021断片を用いて入れ替えるために、pA51214VH'をEcoRVおよびBpu I 1021で切断することによって作製した。それゆえその結果として生じたプラスミドは5.12.14のL鎖およびH鎖両方のネズミ-ヒト可変/定常領域を含んだ。

L鎖およびH鎖を示すpantiIL-8.1を用いるFab発現の予備分析を細胞内で実施したが、大腸菌のペリプラズム空間にほんの少ししか分泌しなかった。この問題を正すために、第二の発現プラスミドを構築した。

第二の発現プラスミドpantiIL-8.2はベクターとしてプラスミドpmy187を用いて構築された。プラスミドpantiIL-8.2をpmy187をMlu I およびSph I を用いて切断することによって作製し、pantiIL-8.1のネズミ5.12.14ネズミ-ヒトキメラFabをコードするMlu I (パーシャル)-Sph I 断片をそれにライゲーションした。それゆえその結果として生じたプラスミドは5.12.14のL鎖およびH鎖両方のネズミ-ヒト可変/定常領域を含んだ。

プラスミドpantiIL-8.2を1995年2月10日にAmerican Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA. (ATCC)に寄託し、ATCC登録番号97056と指定された。本寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下になされた。

G. ネズミ6G4.2.5モノクローナル抗体のL鎖およびH鎖可変領域の分子的クローニング

ChomczynskiとSacchi (Anal. Biochem. 162:156(1987))に記述された方法を用いて 1×10^8 細胞(ハイブリドーマ細胞系6G4.2.5)からRNAを単離した。カップL鎖およびIgG2aH鎖の定常領域(これらの領域のDNA配列はSequences of Proteins of I

mmunological Interest, Kabat等(1991) NIH Publication 91-3242, V 1-3に印刷されている)をコードするネズミRNAの領域とハイブリダイズするようにデザインされた合成DNAオリゴヌクレオチドを用いてmRNAを特別に準備することによって第一ストランドcDNAを合成した。プライマーハイブリダイゼーションの機会と第一ストランドcDNA合成の効率を高めるために各L鎖およびH鎖のために三つのプライマーをデザインした(図21)。第一ストランドcDNAのダブルストランド(ds)DNAへの増幅は、二つのセットの合成DNAオリゴヌクレオチドプライマーを用いて達成される:L鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーおよび一つの逆のプライマー(図22)そしてH鎖可変領域増幅のための一つの正のプライマーおよび一つの逆のプライマー(図23)である。6G4.2.5のL鎖またはH鎖のいずれかの最初の8アミノ酸のN末端配列を、この領域に相当する推定のネズミDNA配列を生じるために用いた(エドマン分解タンパク質配列決定法を用いてL鎖およびH鎖の両方のN末端から合計29アミノ酸

をシークエンスした)。この情報を正の増幅プライマーをデザインするために用い、該プライマーは天然のネズミDNAコドンとのプライマーハイブリダイゼーションの機会を増大するためいくつかのコドンで第3番目の位置が縮重して作られており、ベクターpchimFab内のSTII要素の3'末端へのライゲーションを容易にするためL鎖可変領域正プライマーには独特の制限部位、Nsi Iを、およびH鎖可変領域正プライマーには独特の制限部位、Mlu Iをも含ませた。可変/定常接合部の近くでL鎖またはH鎖の定常領域の部分に相当するネズミDNA配列とアニールするように、逆の増幅プライマーをデザインした。ベクター、pchimFab内でヒトIgG1定常L鎖またはIgG1定常H鎖のそれぞれの5'末端にライゲーションするため、L鎖可変領域逆プライマーは独特のMun I 制限部位を含み、H鎖可変領域逆プライマーは独特のApa I 制限部位を含んだ。これらのプライマーのセットを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、およそ400bpのDNA断片を生じ、p6G425V1およびp6G425VHを形成するためにベクターpchimFab内に個別的にクローン化した。cDNA挿入物はDNAシークエンスにより特徴付けられ、図24(ネズミL鎖可変領域)内と図25(ネズミH鎖可変領域)に存在する。

H.6G4.2.5キメラFabベクターの構築

始めの構築物たるp6G425VLでは、6G4.2.5ネズミL鎖可変配列とヒトIgG1定常L鎖配列内の独特のクローニング部位Mun I の間のアミノ酸は、ネズミ由来のものであった。これらのアミノ酸はキメラFabの正しいホールディングを可能にするためヒトIgGアミノ酸配列にマッチしなければならない。二つのネズミアミノ酸D115およびS121はヒトIgG定常ドメインの β -ストランドのループに見出されるアミノ酸と劇的に異なり、図26に示されたプライマーを用いたサイトディレクトミュータジェネシスによって正しいヒトアミノ酸残基V115およびF121に変換された。これらの特異的なミューテーションはDNAシーケンスにより確かめられ、修正されたプラスミドはp6G425VL'と名付けられた。コード配列を図27に示す。

同様にH鎖可変領域の末端とp6G425VHのヒトIgG1H鎖定常ドメイン内の独特なクローニング部位Apa I の間のDNA配列を、ネズミからヒトへこのエリアのアミノ酸を変化させるために再構成した。この工程はH鎖可変領域の末端に近いBstEII部位の発見により容易になった。この部位およびApa I 部位をIgGヒトアミノ酸配列に

相当するものをコードするDNAの合成断片の付加のために用いた。図26に示されている合成オリゴヌクレオチドをdsDNAの27bpの形成を可能にするためにお互いに相補するように切断した。プラスミドp6G425VHはベクター配列内に付加的なBstEIIを含むため、該構築は三箇所のライゲーションで実施された。Mlu I -Apa I を用いて切断されたp6G425VHの5309断片をプラスミドp6G425VH'を形成するために6G4.2.5H鎖可変領域を運んでいる388bp断片およびヒトIgG1定常領域の最初の6アミノ酸をコードする27bpの合成DNA断片とライゲーションした。DNAの合成断片の挿入はDNAシーケンスにより確認された。コード配列を図28に示す。

6G4.2.5のキメラFabをコードする発現ベクターp6G425chim2をSTIIネズミHPC4H鎖可変領域を除去するためp6G425chimVL'をMlu I およびApa I を用いて切断し、それをp6G425chimVH'のSTIIネズミ6G4.2.5H鎖可変領域をコードするMlu I -Apa I を用いて取り替えることによって作製した。それゆえ結果として生じたプラスミドは、6G4.2.5のL鎖およびH鎖の両方のネズミ-ヒト可変/定常領域を含んだ。

プラスミドp6G425chim2を1995年2月10日にAmerican Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA. (ATCC)に寄託し、ATCC登録番号97055と指定された。本寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下になされた。

I. トランスジェニックマウス喘息モデルにおけるIL-8ホモログ受容体ノックアウトの効果

IL-8は好中球に対する強い誘因物質であり、好酸球活性化もまた示されている。喘息における白血球の移動および活性化でのIL-8の機能を調べるために、野生型およびIL-8ホモログ受容体ノックアウトマウスを利用したアレルギー性喘息に対するネズミモデルを創り出した。ネズミ喘息モデルはアレルギー性IgE力価、気管支肺胞洗浄における好酸球の高パーセンテージ、マクロファージ、リンパ球そして形質細胞の肺粘膜浸および粘液の過分泌を含む、この疾患のいくつかの面を再現する。

Balb/CIL-8ホモログ受容体ノックアウトマウスをbalb/C遺伝子バックグラウンドに対する染色体をもつIL-8ホモログ受容体(IL8Rh)ノックアウトより成る遺伝子型が得られるまで、balb/Cマウスに対してC57BL/6JIL8Rhノックアウトマウス

(Caralano等, Science, 265:682-684(1994)の方法にしたがって生産された)を掛け合わせることによって生じさせた。メスのBalb/C野生型(WT)およびIL-8ホモログ受容体ノックアウト(KO)同腹子を掛け合わせ、尾からのサンプリングにより遺伝子型をチェックした。動物は研究の始めで6から8週齢であった。WTおよびKOの両方をコントロールと喘息のグループにランダムに分け、各グループは統計的分析のため7匹の動物を含むようにした。喘息のグループにはダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)(HyClone, UT)中に100 μ g/mlオボアルブミングレードV(Sigma, MO)および10mg/ml酸化アルミニウム(Intergen, NY)を含む溶液の0.1mlを用いて、0日に腹膜内に注射した。14日から20日に喘息グループとコントロールグループの両方にDPBS中の10mg/mlオボアルブミンの溶液を用いて各日30分間エアロゾルにして散布した。エアロゾル散布は1.7ml/分の噴射にセットしたUltra-Neb99

ネブライザー (DeVilbiss, PA) を接続した $16.5 \times 17 \times 52 \text{ cm}$ のプレキシグラスかご内に14匹の動物を置くことによって実施された。以下に示すように21日に血清、全血、気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取した。

血液は眼窩洞から集め Microtainer Serum Separator (Becton Dickinson, NJ) 内で血清採集のため凝固した。

オボアルブミン特異的 IgE 力価を以下のように測定した。Maxi-Sorp F96 Nunc-イムノプレート (Nunc, Denmark) 内のウェルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の $2 \mu\text{g/ml}$ $\text{Fc}\epsilon\text{RI-HuIgG1}$ (Haak-Frendscho 等, J. Immunol., 151:351-358 (1993) に記述されているように得られた) の $100 \mu\text{l}$ を用いてそれぞれコートし、 4°C オーバーナイトでインキュベートした。プレートを PBS で二回すすぎ、コートされたウェルを $400 \mu\text{l}$ のブロッキング溶液 (PBS 内に 50 mM トリス緩衝生理食塩水、 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA)、 0.05% Tween20) 内で室温 (RT) で 1-2 時間インキュベートした。血清サンプルをブロッキング溶液内で連続的に希釈し (1:20 の希釈から始める)、各希釈溶液をコートされたウェル内に層状に重ねた。プレートを振動と共に RT で 2 時間インキュベートした。

血清サンプルと共なるコートされたプレーとのインキュベーションに引き続いて、プレートを洗浄バッファーで 3 回すすぎ、各ウェルを RT で 1 時間ブロッキングバッファー内の $10 \mu\text{g/ml}$ オボアルブミンの $100 \mu\text{l}$ を用いてインキュベートした。ヤギ抗オボアルブミン (Cappel (Organon Teknika) カタログナンバー 55297、Durham, NC) をセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) に接合し、ブロッキングバッファーで 1:7000 に希釈した。それからプレートを洗浄バッファーで 3 回洗い、各ウェルを RT で 1 時間振動と共に HRP-接合ヤギ抗オボアルブミン希釈液の $100 \mu\text{l}$ を用いてインキュベートした。プレートを再び洗浄バッファーで 3 回洗い、各ウェルを RT で 30 分 $100 \mu\text{l}$ o-フェニレンジアミンジヒドロクロライド (OPD) 溶液 (一錠の 5 mg OPD の錠剤、 12.5 ml PBS そして $5 \mu\text{l}$ H_2O_2 を混ぜた) および $100 \mu\text{l}$ 2 M H_2SO_4 内で顕色させた。プレートを UV Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices, CA) 内で 492 nm で蛍光をアッセイした。

全血を 0.2% K_2EDTA 内に眼窩洞から採集し、凝血をチェックした。各動物の血液

スメアを空気乾燥し、メタノールで固定し、Diff-Quick(Baxter, IL)を用いて染色した。これらのスライドの顕微鏡検査により好酸球、マクロファージ、リンパ球、好中球および好塩基球特異形態を測定した。Serono 9018 Hematology Analyzer(Baker Diagnostics, NJ)で全血の1:250希釈液の10mlを分析することによってヘモグラムを得た。全細胞数の計算はマウス体重の7%が血液であると仮定することによってなされた。

単一の腹膜内注射で運ばれた0.1mg/kg塩酸ケタミン(Ketaset, Fort Dodge Laboratories, IO)および0.5mg/kg Acepromazine Maleate(PromAce, Aveco Co. Inc., IO)を用いてマウスに麻酔をかけた。マウスを背側を下にして置き、気管を外科的にさらしカニューレを挿入するために1/2から2/3まで切開した。カニューレ(Micro-renathane, 0.0400D×0.025ID)に22ゲージの短い太い針を接続し、これに二つの3ccシリンジを組み立てた3方向バルブを接続した。一つのシリンジに2ml HBSS(Bio Whittaker, MD)を含ませ、残りのシリンジは採集のため空にした。4×0.5mlの等分したHBSSを用いて肺を穏やかに洗浄し、その液を空のシリンジに集めた。一度採集されると洗浄液を冷蔵し続けた。

洗浄液中の細胞を沈殿化し、0.2mlの塩水に再懸濁した。上述のようにヘモグラムを得、濃度を200-400細胞/ μ lに調節した。150 μ lの等分液をShandon Cytospin 3遠心機を用いてスライドを調製するのに利用した。スライドを乾燥させ、固定し、染色して特異形態を上述のように観察した。

洗浄液を採集した後マウスを頸部脱臼により安楽死させ、肺を外科的に摘出した。22ゲージの短い太い針を装着した3ccシリンジを10%中性緩衝ホルマリン、pH

6.8-7.2(Richard-Allan, MI)でいっぱいにし、気管内に挿入した。肺を穏やかに膨らませ、気管を縫合した。更なる加工のため組織標本を10%緩衝ホルマリンで貯蔵した。

左葉の縦の切片および3つの右葉の横断面にカットし、水をパラフィンに交換するためにサンプルをTissueTek VIP(Miles, NY)で加工し、各サンプルをパラフィンキューブに包埋し、ミクロトームカット(Leica, Germany)により超薄切片を得、スライドに超薄切片を置き、ヘマトキシリン-エオシンを用いて乗せられたサ

ンプルを染色しそしてカバーガラスで封をすることによって肺組織標本を調製した。

以下の表IIおよび図29に示されている喘息IL8RhKOマウスおよび喘息WTマウスから得られた好酸球気管支肺胞洗浄(BAL)数に示されているように、WT喘息マウスと比較すると喘息KOマウスでは気管支肺胞洗浄における好酸球の数において劇的に18倍の減少が存在した。

表II. アレルゲンチャレンジに対する白血球集団の μ IL8Rh調節

細胞タイプ	マウス 遺伝子型	循環血液 細胞	BAL細胞 (BAL)	循環細胞の BAL細胞%	WT:KO 比
eos	WT KO	1293566 336697	422348 55877	32.65 16.60	1.97
lympho	WT KO	6596926 7247362	156121 69341	2.37 0.96	2.47
neutro	WT KO	2442790 4190160	12529 1174	0.51 0.03	18.31

コントロールおよび喘息動物血清におけるオボアルブミン特異的IgE力価により、喘息グループの全ての動物が毎日エアロゾルにさらされる過程でオボアルブミンに過敏になっていた。それゆえKO喘息マウスで観察された減少した好酸球応答は、アレルゲン過敏化の不存在のためであった。好酸球はロイコトリエンC4を合成し、マスト細胞および好塩基球からのエラスターゼ放出を刺激し、主要塩基性タンパク質を放出することによって喘息の病因に寄与することが知られているので、減少した好酸球応答は喘息のマウス肺の総合的な病状における改善を示す。

IL8Rhの欠失は直接的に肺内への細胞の移住に影響し、間接的に好酸球の増殖および/または循環半減期を調節することによって肺好酸球浸透を減少し得る。

図3

0に示されているように、喘息WT動物における末梢血好酸球数は繰り返されるアレルゲンを用いた刺激により24倍増大し、その一方でKO動物は3倍の増大を示した。ヒト喘息もまた循環好酸球の増大したレベルが存在するので、これらのデータはIL-8がヒト内の好酸球の発達に中枢の役割を果たすことを強く示す。

上記表IIおよび図31に示されているように、WTマウスと比較してKOマウスは循

環好酸球に対する浸透の部分において2倍の減少を示した。これはネズミ IL8Rh(muIL8Rh)が好酸球が気管の管腔に肺の内皮および上皮を通過して移動することを可能にすることに直接的に含まれることの強い証拠となる。この移住障害はまたリンパ球および好中球に対しても観察される。上記表IIに示されているように、WT喘息マウスと比較して喘息 IL8RhKOマウスでは、気管支肺胞洗浄液でリンパ球および好中球の数においてそれぞれ2.5倍および18倍の減少が存在した。これらのデータはヒトリンパ球および好中球はIL-8受容体を持っていることが知られており、喘息ヒトドナー由来の好酸球は同様にIL-8受容体を示すことが知られているという事実に照らして特に重要性をもつ。

リンパ球浸透応答におけるmuIL8Rhの総合的な効果は、図33-41に示されている肺切片の顕微鏡分析から明白である。たとえばKOマウスにまだ白血球の穏やかな肺の浸透が存在しているとしても、総合的なひどさはWT動物と比較して著しく減少しており、WT動物では平均的な並みの浸透および著しい浸透が存在していた。それほどひどくないWT喘息動物でさえ、ほとんどすべての気管支及び血管が単球および好酸球である程度末梢で浸透されているが(図36-35に示されている)、その一方でほとんどの影響を受けているKOマウスでは主要気管支だけが影響を受けているのみであった(図39-41に示されている)。

このネズミ喘息モデルはヒトアレルギー性喘息の鍵となる生理学上の特徴の多くを再現しているため、およびmuIL8Rhはいくつかの喘息の特徴の発達において劇的な役割を果たしているため、これらのデータは特に白血球浸透応答のコントロールに関してはヒトにおける喘息の病因においてIL-8が重要な役割を演じていることを強く示唆する。IL-8拮抗剤の使用はベースラインレベルに近づけるために循環好酸球のプールを減少し、浸透好酸球およびリンパ球の数を減少することによって肺の総合的な病状を改善することが可能である。好酸球は平滑筋収縮およびその結果として気管支収縮を誘発するのに役割を果たすヒスタミンを放出する

ためにマスト細胞および好塩基球を刺激するので、IL-8拮抗剤を用いた治療は空気流障害の強さおよび/または頻度を減少し、喘息患者の総合的な肺機能を改善

することが期待される。

IL-8拮抗剤を用いた喘息の治療は上述のネズミ喘息モデルのものと同様のプロトコールを使用したアレルゲンを用いたエアロゾル化が引き続くアレルゲンの腹膜内注射によって喘息を誘発するという、霊長類喘息モデルを用いることによって研究されている。用いられるアレルゲンはオボアルブミンまたはちりダニ、ブタクサ、ネコ鱗屑等のような人にアレルギーを引き起こすことが知られている他のいかなるアレルゲンをも含む。予防治療様式は上述のようなアレルゲンを用いたエアロゾル化による喘息の誘発の約10分前までに、約0.1から10mg/kgの単一巨丸剤投与量で静脈内に投与される抗IL-8抗体を用いて(または化合物の薬力学的プロフィールにしたがって決定された投与量で静脈内に投与される小分子IL-8拮抗剤を用いて)動物を前処理することによって研究される。IL-8拮抗剤を用いた前処理は喘息の誘発に起因する徴候の開始を予防するまたは減少することが期待される。同様に治療上の治療様式は上述のように動物に喘息を誘発し、約0.1から10mg/kgの単一の巨丸剤投与量で静脈内に投与された抗IL-8抗体を用いて(または化合物の薬力学的プロフィールにしたがって決定された投与量で静脈内に投与される小分子IL-8拮抗剤を用いて)喘息の発症に引き続いて動物を治療することによって研究される。発症後にIL-8拮抗剤を用いた治療上の治療は喘息の誘発に起因する徴候を減少または除去することが期待される。

配列表

(1)一般情報

(i)出願人：Genentech, Inc.

(ii)発明の名称：肝細胞増殖因子受容体拮抗剤とその使用法

(iii)配列の数：58

(iv)相当する住所

(A)住所：Genentech, Inc.

(B)通り：460 Point San Bruno Blvd

(C)都市名：South San Francisco

(D)州：California

(E)国名：USA

(F)郵便番号：94080

(V)コンピューターが読み込むことのできる形態

(A)媒体種：3.5インチ、1.44Mb フロッピーディスク

(B)コンピューター：IBM PC互換機

(C)オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D)ソフトウェア：WinPatin(Genentech)

(vi)現出願の情報

(A)出願番号

(B)出願日

(C)分類

(vii)代理人の情報

(A)名前：Love, Richard B.

(B)登録番号：34,659

(C)委託/事件番号：P0874P2PCT

(viii)通信情報

(A)テレフォーン：415/225-5530

(B)テレファックス：415/952-9881

(C)テレックス：910/371-7168

(2)配列番号(SEQ ID NO):1の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：22ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:1：

CAGTCCAACT GTTCAGGACG CC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):2の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：22ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:2：

GTGCTGCTCA TGCTGTAGGT GC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):3の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:23ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:3:

GAAGTTGATG TCTTGTGAGT GGC 23

(2)配列番号(SEQ ID NO):4の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:24ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:4:

GCATCCTAGA GTCACCGAGG AGCC 24

(2)配列番号(SEQ ID NO):5の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:22ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:5:

CACTGGCTCA GGGAAATAAC CC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):6の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:22ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:6:

GGAGAGCTGG GAAGGTGTGC AC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):7の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:35ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:7:

ACAAACGCGT ACGCTGACAT CGTCATGACC CAGTC 35

(2)配列番号(SEQ ID NO):8の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:35ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:8:

ACAAACGCGT ACGCTGATAT TGTCATGACT CAGTC 35

(2)配列番号(SEQ ID NO):9の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：35ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:9:

ACAAACGCGT ACGCTGACAT CGTCATGACA CAGTC 35

(2)配列番号(SEQ ID NO):10の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：37ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:10:

GCTCTTCGAA TGGTGGGAAG ATGCATACAG TTGGTGC 37

(2)配列番号(SEQ ID NO):11の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ：39ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:11:

CGATGGGCCC GGATAGACCG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):12の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ：39ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:12:

CGATGGGCCC GGATAGACTG ATGGGGCTGT CGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):13の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ：39ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:13:

CGATGGGCCC GGATAGACGG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号 (SEQ ID NO):14の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ: 39ベースペアー
- (B)型: 核酸
- (C)ストランド: シングル
- (D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:14:

CGATGGGCCC GGATAGACAG ATGGGGCTGT TGTTTTGGC 39

(2)配列番号 (SEQ ID NO):15の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ: 39ベースペアー
- (B)型: 核酸
- (C)ストランド: シングル
- (D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:15:

CGATGGGCCC GGATAGACCG ATGGGGCTGT TGTTTTGGC 39

(2)配列番号 (SEQ ID NO):16の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ: 39ベースペアー
- (B)型: 核酸
- (C)ストランド: シングル
- (D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:16：

CGATGGGCCC GGATAGACTG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):17の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：39ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:17：

CGATGGGCCC GGATAGACAG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):18の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：39ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:18：

CGATGGGCCC GGATAGACGG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):19の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：369ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:19:

```

GACATTGTCA TGACACAGTC TCAAAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA 50
CAGGGTCAGC GTCACCTGCA AGGCCAGTCA GAATGTGGGT ACTAATGTAG 100
CCTGGTATCA ACAGAAACCA GGGCAATCTC CTAAAGCACT GATTTACTCG 150
TCATCCTACC GGTACAGTGG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC 200
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCCA TGTGCAGTCT GAAGACTTGG 250
CAGACTATTT CTGTCAGCAA TATAACATCT ATCCTCTCAC GTTCGGTCCT 300
GGGACCAAGC TGGAGTTGAA ACGGGCTGAT GCTGCACCAC CAACTGTATC 350
CATCTTCCCA CCATTGAA 369

```

(2)配列番号(SEQ ID NO):20の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：123アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:20:

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
 1             5             10             15
Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly
                20             25             30
Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
                35             40             45
Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
                50             55             60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                65             70             75
Ser His Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln

```

	80		85		90
Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly	Pro Gly Thr Lys Leu Glu				
95	100				105
Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro					
110	115				120
Pro Phe Glu					
123					

(2)配列番号 (SEQ ID NO):21の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ: 417ベースペアー
- (B)型: 核酸
- (C)ストランド: シングル
- (D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:21:

```

TTCTATTGCT ACAAACCGGT ACGCTGAGGT GCAGCTGGTG GAGTCTGGGG 50
GAGGCTTAGT GCCGCCTGGA GGGTCCCTGA AACTCTCCTG TGCAGCCTCT 100
GGATTCAAT TCAGTAGTTA TGGCATGTCT TGGGTTCGCC AGACTCCAGG 150
CAAGAGCCTG GAGTTGGTCG CAACCATTAA TAATAATGGT GATAGCACCT 200
ATTATCCAGA CAGTGTGAAG GGCCGATTCA CCATCTCCCG AGACAATGCC 250
AAGAACACCC TGTACCTGCA AATGAGCAGT CTGAAGTCTG AGGACACAGC 300
CATGTTTAC TGTGCAAGAG CCCTCATTAG TTCGGCTACT TGGTTTGGTT 350
ACTGGGGCCA AGGGACTCTG GTCAGTGTCT CTGCAGCCAA AACAACAGCC 400
CCATCTGTCT ATCCGGG 417

```

(2)配列番号 (SEQ ID NO):22の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ: 130アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列 : SEQ ID NO:22 :

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	35	40	45	
Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Asn	Asn	Asn	Gly	Asp	Ser	Thr	Tyr	Tyr	50	55	60	
Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Met	Phe	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Ala	Thr	95	100	105	
Trp	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	110	115	120	
Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	125	130							

(2)配列番号(SEQ ID NO):23の情報 :

(i)配列の特徴

- (A)長さ : 31ベースペアー
- (B)型 : 核酸
- (C)ストランド : シングル
- (D)トポロジー : 直鎖状

(xi)配列 : SEQ ID NO:23 :

ACAAACGCGT ACGCTGATAT CGTCATGACA G 31

(2)配列番号(SEQ ID NO):24の情報 :

(i)配列の特徴

- (A)長さ：31ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:24：

GCAGCATCAG CTCTTCGAAG CTCCAGCTTG G 31

(2)配列番号 (SEQ ID NO):25の情報：

(i)配列の特徴

- (A)長さ：21ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:25：

CCACTAGTAC GCAAGTTCAC G 21

(2)配列番号 (SEQ ID NO):26の情報：

(i)配列の特徴

- (A)長さ：33ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:26：

GATGGGCCCT TGGTGGAGGC TGCAGAGACA GTG 33

(2)配列番号 (SEQ ID NO):27の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:714ベースペア

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:27:

```
ATGAAGAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTG TTTTTTCTAT 50
TGCTACAAAC GCGTACGCTG ATATCGTCAT GACACAGTCT CAAAAATTCA 100
TGTCCACATC AGTAGGAGAC AGGGTCAGCG TCACCTGCAA GGCCAGTCAG 150
AATGTGGGTA CTAATGTAGC CTGGTATCAA CAGAAACCAG GGCAATCTCC 200
TAAAGCACTG ATTTACTCGT CATCCTACCG GTACAGTGA GTCCCTGATC 250
GCTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC CATCAGCCAT 300
GTGCAGTCTG AAGACTTGGC AGACTATTTT TGTCAGCAAT ATAACATCTA 350
TCCTCTCACG TTCGGTCCTG GGACCAAGCT GGAGCTTCGA AGAGCTGTGG 400
CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT 450
GGAAGTCTT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC 500
CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG 550
AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC 600
ACCGTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG 650
CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA 700
GGGGAGAGTG TTAA 714
```

(2)配列番号 (SEQ ID NO):28の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:237アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(C)トポロジー:直鎖状

Met 1	Lys	Lys	Asn	Ile 5	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala 10	Ser	Met	Phe	Val	Phe 15
Ser	Ile	Ala	Thr	Asn 20	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ile 25	Val	Met	Thr	Gln	Ser 30
Gln	Lys	Phe	Met	Ser 35	Thr	Ser	Val	Gly	Asp 40	Arg	Val	Ser	Val	Thr 45
Cys	Lys	Ala	Ser	Gln 50	Asn	Val	Gly	Thr	Asn 55	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln 60
Gln	Lys	Pro	Gly	Gln 65	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu 70	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ser 75
Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly 80	Val	Pro	Asp	Arg	Phe 85	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser 90
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr 95	Leu	Thr	Ile	Ser	His 100	Val	Gln	Ser	Glu	Asp 105
Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe 110	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn 115	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr 120
Phe	Gly	Pro	Gly	Thr 125	Lys	Leu	Glu	Leu	Arg 130	Arg	Ala	Val	Ala	Ala 135
Pro	Ser	Val	Phe	Ile 140	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp 145	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser 150
Gly	Thr	Ala	Ser	Val 155	Val	Cys	Leu	Leu	Asn 160	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg 165
Glu	Ala	Lys	Val	Gln 170	Trp	Lys	Val	Asp	Asn 175	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly 180
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser 185	Val	Thr	Glu	Gln	Asp 190	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr 195
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 200	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser 205	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu 210
Lys	His	Lys	Val	Tyr 215	Ala	Cys	Glu	Val	Thr 220	His	Gln	Gly	Leu	Ser 225
Ser	Pro	Val	Thr	Lys 230	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly 235	Glu	Cys 237			

(A)長さ : 756ページ

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:29:

ATGAAAAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTCTG TTTTTTCTAT 50
 TGCTACAAAC GCGTACGCTG AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT 100
 TAGTGCCGCC TGGAGGGTCC CTGAAACTCT CCGTGCAGC CTCTGGATTC 150
 ATATTAGTA GTTATGGCAT GTCTTGGGTT CGCCAGACTC CAGGCAAGAG 200
 CCTGGAGTTG GTCGCAACCA TTAATAATAA TGGTGATAGC ACCTATTATC 250
 CAGACAGTGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCCGAGACAA TGCCAAGAAC 300
 ACCCTGTACC TGCAAATGAG CAGTCTGAAG TCTGAGGACA CAGCCATGTT 350
 TTAGTGTGCA AGAGCCCTCA TTAGTTCGGC TACTTGTTTT GGTACTGGG 400
 GCCAAGGGAC TCTGGTCACT GTCTCTGCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG 450
 GTCTTCCCCC TGGCACCCCTC CTCCAAGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC 500
 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT 550
 GGAAGTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA 600
 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG 650
 CAGCTTGGGC ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCCAGCA 700
 ACACCAAGGT GGACAAGAAA GTTGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACTCAC 750
 ACATGA 756

(2)配列番号(SEQ ID NO):30の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：251アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:30:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe		1	5	10	15
Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser		20	25	30	
Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys		35	40	45	
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val		50	55	60	
Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Asn		65	70	75	
Asn	Asn	Gly	Asp	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg		80	85	90	
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln		95	100	105	
Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Phe	Tyr	Cys	Ala		110	115	120	
Arg	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Ala	Thr	Trp	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln		125	130	135	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser		140	145	150	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		155	160	165	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		170	175	180	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		185	190	195	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		200	205	210	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile		215	220	225	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys		230	235	240	
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr						245	250	251	

(2)配列番号(SEQ ID NO):31の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:22ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:31:

CAGTCCAACT GTTCAGGACG CC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):32の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：22ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:32:

GTGCTGCTCA TGCTGTAGGT GC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):33の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：23ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:33:

CAAGTTGATG TCTTGTGAGT GGC 23

(2)配列番号(SEQ ID NO):34の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:24ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:34:

GCATCCTAGA GTCACCGAGG AGCC 24

(2)配列番号(SEQ ID NO):35の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:22ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:35:

CACTGGCTCA GGGAAATAAC CC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):36の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:22ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:36:

GGAGAGCTGC CAAGGTGTGC AC 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):37の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ: 37ベースペアー

(B)型: 核酸

(C)ストランド: シングル

(D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:37:

CCAATGCATA CGCTGACATC GTGATGACCC AGACCCC 37

(2)配列番号(SEQ ID NO):38の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ: 37ベースペアー

(B)型: 核酸

(C)ストランド: シングル

(D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:38:

CCAATGCATA CGCTGATATT GTGATGACTC AGACTCC 37

(2)配列番号(SEQ ID NO):39の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ: 37ベースペアー

(B)型: 核酸

(C)ストランド: シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:39:

CCAATGCATA CGCTGACATC GTGATGACAC AGACACC 37

(2)配列番号(SEQ ID NO):40の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：35ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:40:

AGATGTCAAT TGCTCACTGG ATGGTGGGAA GATGG 35

(2)配列番号(SEQ ID NO):41の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：32ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:41:

CAAACGCGTA CGCTGAGATC CAGCTGCAGC AG 32

(2)配列番号(SEQ ID NO):42の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ：32ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:42：

CAAACGCGTA CGCTGAGATT CAGCTCCAGC AG 32

(2)配列番号(SEQ ID NO):43の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：39ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:43：

CGATGGGCCC GGATAGACCG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):44の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：39ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:44：

CGATGGGCCC GGATAGACTG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):45の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ:39ベースペアー
- (B)型:核酸
- (C)ストランド:シングル
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:45:

CGATGGGCCC GGATAGACAG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):46の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ:39ベースペアー
- (B)型:核酸
- (C)ストランド:シングル
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:46:

CGATGGGCCC GGATAGACGG ATGGGGCTGT TGT TTTGGC 39

(2)配列番号(SEQ ID NO):47の情報:

(i)配列の特徴

- (A)長さ:391ベースペアー
- (B)型:核酸
- (C)ストランド:シングル
- (D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列 : SEQ ID NO:47 :

GATATCGTGA TGACACAGAC ACCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGAGAGA 50
 TCAGGCCTCC ATCTCTTGCA GATCTAGTCA GAGCCTTGTA CACGGTATTG 100
 GAAACACCTA TTTACATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA GTCTCCAAAG 150
 CTCCTGATCT ACAAAGTTTC CAACCGATTT TCTGGGGTCC CAGACAGGTT 200
 CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTAC ACTCAGCATC AGCAGAGTGG 250
 AGGCTGAGGA TCTGGGACTT TATTTCTGCT CTCAAAGTAC ACATGTTCCG 300
 CTCACGTTCC GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAACGGG CTGATGCTGC 350
 ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAATTG A 391

(2)配列番号 (SEQ ID NO):48の 情報 :

(i)配列の特徴

(A)長さ : 131アミノ酸

(B)型 : アミノ酸

(C)トポロジー : 直鎖状

(xi)配列 : SEQ ID NO:48 :

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	1	5	10	15
Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	20	25	30	
His	Gly	Ile	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	35	40	45	
Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	65	70	75	
Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Leu	80	85	90	
Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	95	100	105	
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	110	115	120	
Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Lys	125	130	131					

(2)配列番号(SEQ ID NO):49の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:405ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:49:

```
GAGATTCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAG CTGATGAAGC CTGGGGCTTC 50
AGTGAAGATA TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA TTCATTTCAGT AGCCACTACA 100
TGCACTGGGT GAAGCAGAGC CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGCTAC 150
ATTGATCCTT CCAATGGTGA AACTACTTAC AACCAGAAAT TCAAGGGCAA 200
GGCCACATTG ACTGTAGACA CATCTCCAG CACAGCCAAC GTGCATCTCA 250
GCAGCCTGAC ATCTGATGAC TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGGGAC 300
TATAGATACA ACGGCGACTG GTTTTTCGAT GTCTGGGGNG NAGGGACCAC 350
GGTCACCGTC TCCTCCGCCA AAACCGACAG CCCCATCGGT CTATCCGGGC 400
CCATC 405
```

(2)配列番号(SEQ ID NO):50の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:135アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(C)トポロジー:直鎖状

(xi)配列:SEQ ID NO:50:

Glu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	1	5	10	15
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	His	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Ser	Asn	Gly	Glu	Thr	Thr	Tyr	50	55	60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Ser	Ser	Thr	Ala	Asn	Val	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	80	85	90	
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	95	100	105	
Asp	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Xaa	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	110	115	120	
Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Asp	Ser	Pro	Ile	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Ile	125	130	135	

(2)配列番号(SEQ ID NO):51の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ: 22ベースペアー

(B)型: 核酸

(C)ストランド: シングル

(D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:51:

CTTGGTGGAG GCGGAGGAGA CG 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):52の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ: 38ベースペアー

(B)型: 核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:52：

GAAACGGGCT GTTGCTGCAC CAACTGTATT CATCTTCC 38

(2)配列番号(SEQ ID NO):53の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：31ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:53：

GTCACCGTCT CCTCCGCCTC CACCAAGGGC C 31

(2)配列番号(SEQ ID NO):54の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：22ベースペアー

(B)型：核酸

(C)ストランド：シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:54：

CTTGGTGGAG GCGGAGGAGA CG 22

(2)配列番号(SEQ ID NO):55の情報：

(i)配列の特徴

- (A)長さ：729ベースペアー
- (B)型：核酸
- (C)ストランド：シングル
- (D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:55：

```
ATGAAGAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTGG TTTTCTCTAT 50
TGCTACAAAT GCATACGCTG ATATCGTGAT GACACAGACA CCACTCTCCC 100
TGCCTGTCAG TCTTGGAGAT CAGGCCTCCA TCTCTGCAG ATCTAGTCAG 150
AGCCTTGTAC ACGGTATTGG AAACACCTAT TTACATTGGT ACCTGCAGAA 200
GCCAGGCCAG TCTCCAAAGC TCCTGATCTA CAAAGTTTCC AACCGATTTT 250
CTGGGGTCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTTACA 300
CTCAGGATCA GCAGAGTGGA GGCTGAGGAT CTGGGACTTT ATTTCTGCTC 350
TCAAAGTACA CATGTTCCGC TCACGTTTCGG TGCTGGGACC AAGCTGGAGC 400
TGAAACGGGC TGTTGCTGCA CCAACTGTAT TCATCTTCCC ACCATCCAGT 450
GAGCAATTGA AATCTGGAAC TGCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT 500
CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT 550
CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC 600
TACAGCCTCA GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA 650
CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA 700
CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAA 729
```

(2)配列番号(SEQ ID NO):56の情報：

(i)配列の特徴

- (A)長さ：242アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (C)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:56：

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe	
1				5					10					15	
Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	
				20					25					30	
Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	
				35					40					45	
Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Gly	Ile	Gly	Asn	Thr	Tyr	
				50					55					60	
Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	
				65					70					75	
Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	
				80					85					90	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	
				95					100					105	
Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	
				110					115					120	
His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	
				125					130					135	
Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	
				140					145					150	
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	
				155					160					165	
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	
				170					175					180	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
				185					190					195	
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
				200					205					210	
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	
				215					220					225	
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	
				230					235					240	
Glu	Cys														

(2)配列番号 (SEQ ID NO):57の情報:

(i)配列の特徴

(A)長さ:762ベースペアー

(B)型:核酸

(C)ストランド:シングル

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:57：

```

ATGAAAAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTCTG TTTTCTCTAT 50
TGCTACAAAC GCGTACGCTG AGATTCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC 100
TGATGAAGCC TGGGGCTTCA GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAT 150
TCATTTCAGTA GCCACTACAT GCACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG 200
CCTTGAGTGG ATTGGCTACA TTGATCCTTC CAATGGTGAA ACTACTTACA 250
ACCAGAAATT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGACAC ATCTTCCAGC 300
ACAGCCAACG TGCATCTCAG CAGCCTGACA TCTGATGACT CTGCAGTCTA 350
TTTCTGTGCA AGAGGGGACT ATAGATACAA CGGCGACTGG TTTTTCGATG 400
TCTGGGGCGC AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCCGCCTC CACCAAGGGC 450
CCATCGGTCT TCCCCCTGGC ACCCTCCTCC AAGAGCACCT CTGGGGGGCAC 500
AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG 550
TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT 600
GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC 650
CTCCAGCAGC TTGGGCACCC AGACCTACAT CTGCAACGTG AATCACAAGC 700
CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAAAGTTG AGCCCAAATC TTGTGACAAA 750
ACTCACACAT GA 762

```

(2)配列番号(SEQ ID NO):58の情報：

(i)配列の特徴

(A)長さ：253アミノ酸

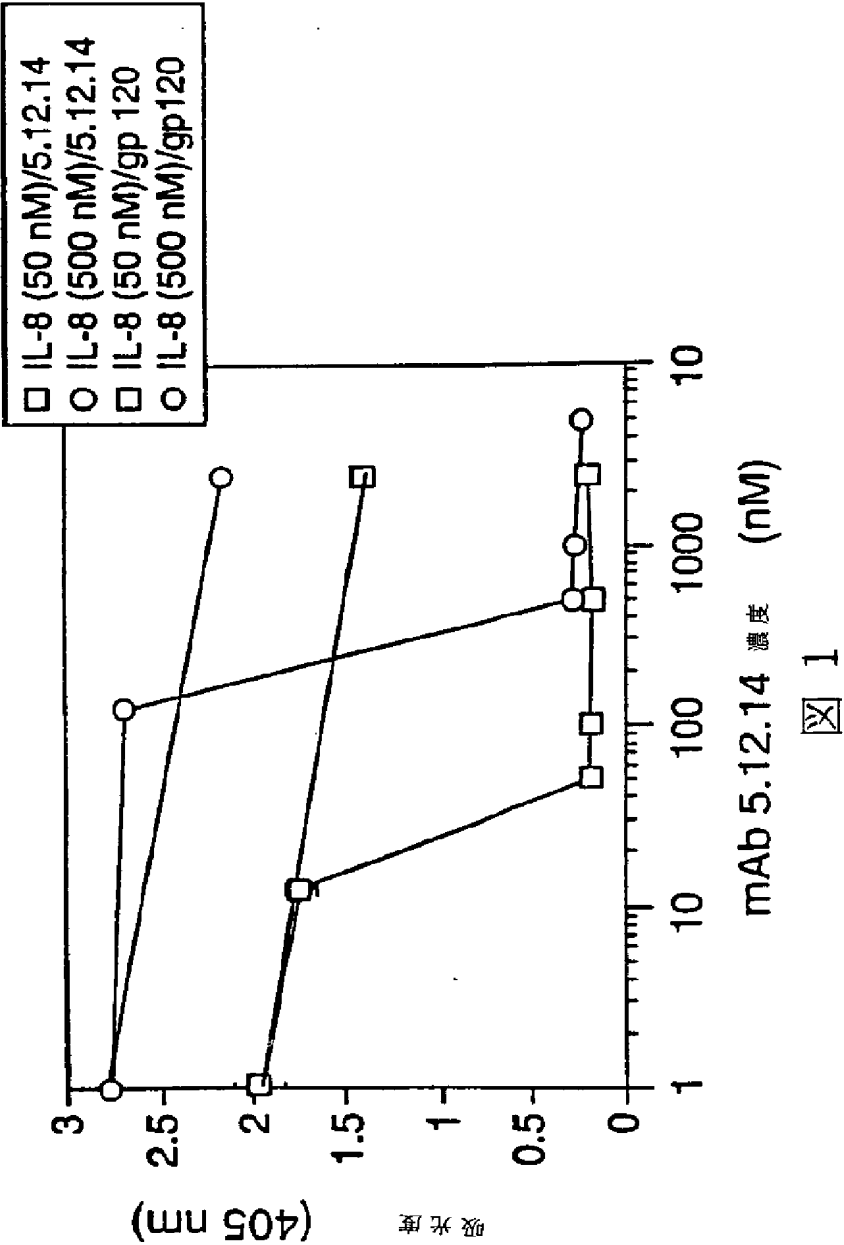
(B)型：アミノ酸

(C)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:58：

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe	
1				5					10					15	
Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	
				20					25					30	
Gly	Pro	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	
				35					40					45	
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ser	His	Tyr	Met	His	Trp	Val	
				50					55					60	
Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asp	
				65					70					75	
Pro	Ser	Asn	Gly	Glu	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	
				80					85					90	
Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Asn	Val	His	
				95					100					105	
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	
				110					115					120	
Arg	Gly	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gly	Asp	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	
				125					130					135	
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
				140					145					150	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
				155					160					165	
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				170					175					180	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
				185					190					195	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
				200					205					210	
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
				215					220					225	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
				230					235					240	
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr			
				245					250			253			

【 図 1 】



【図2】

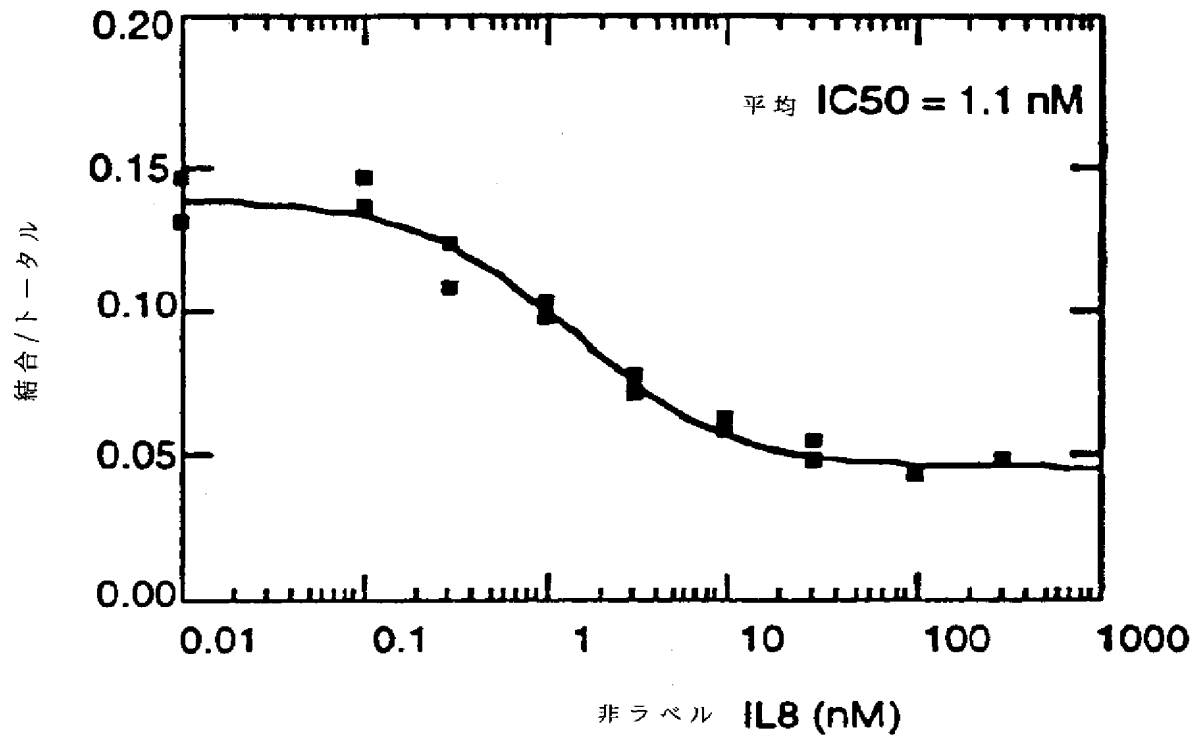


図 2

【図3】

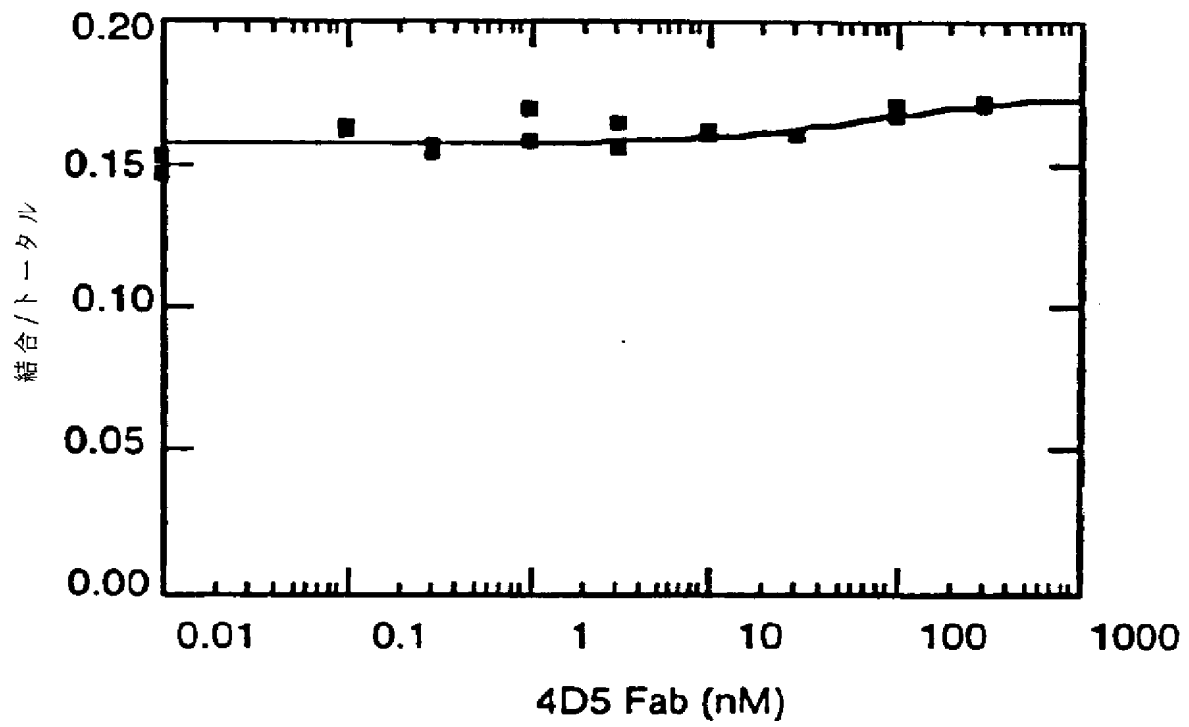


図 3

【図4】

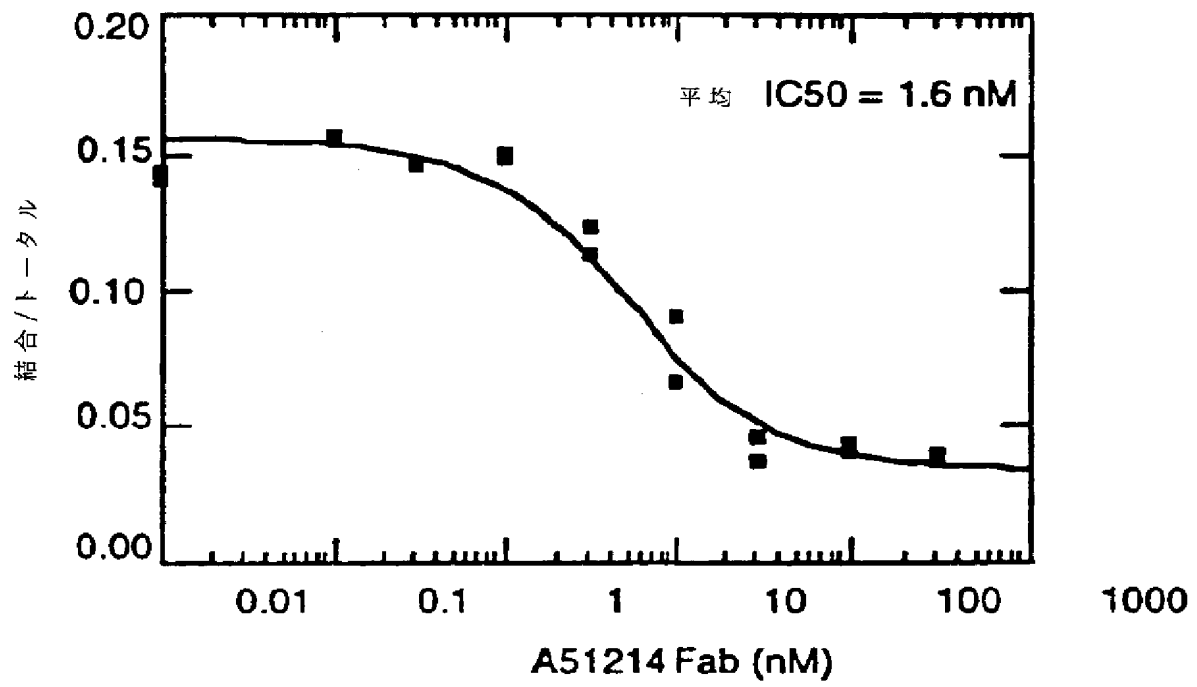


図 4

【図5】

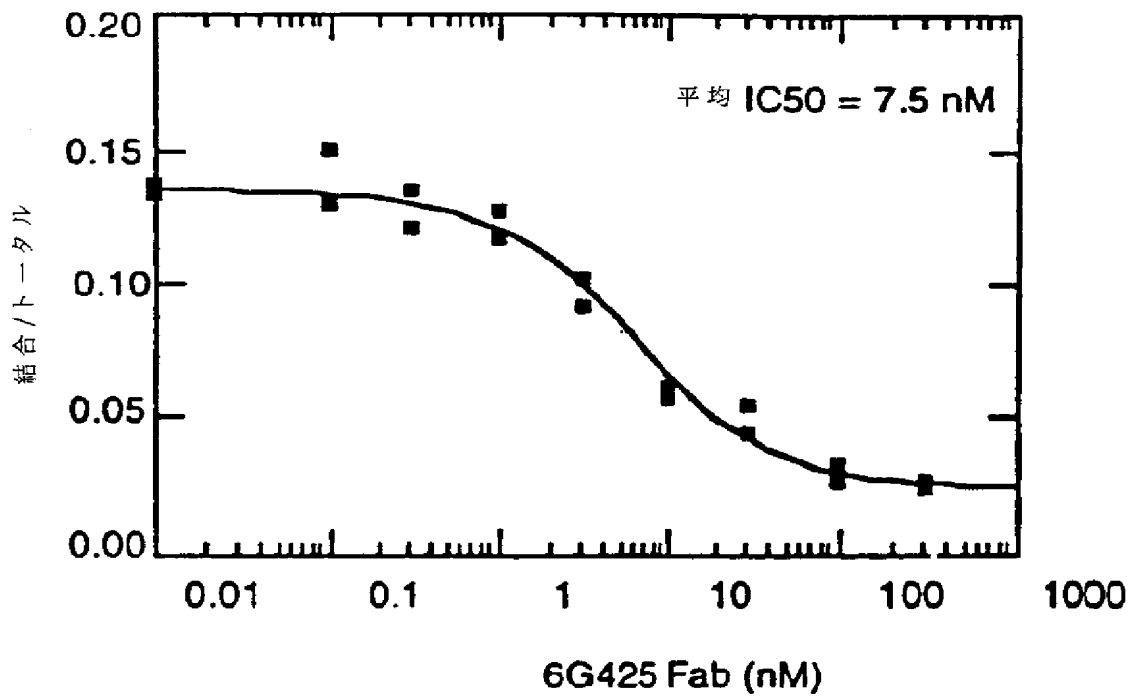


図 5

【図6】

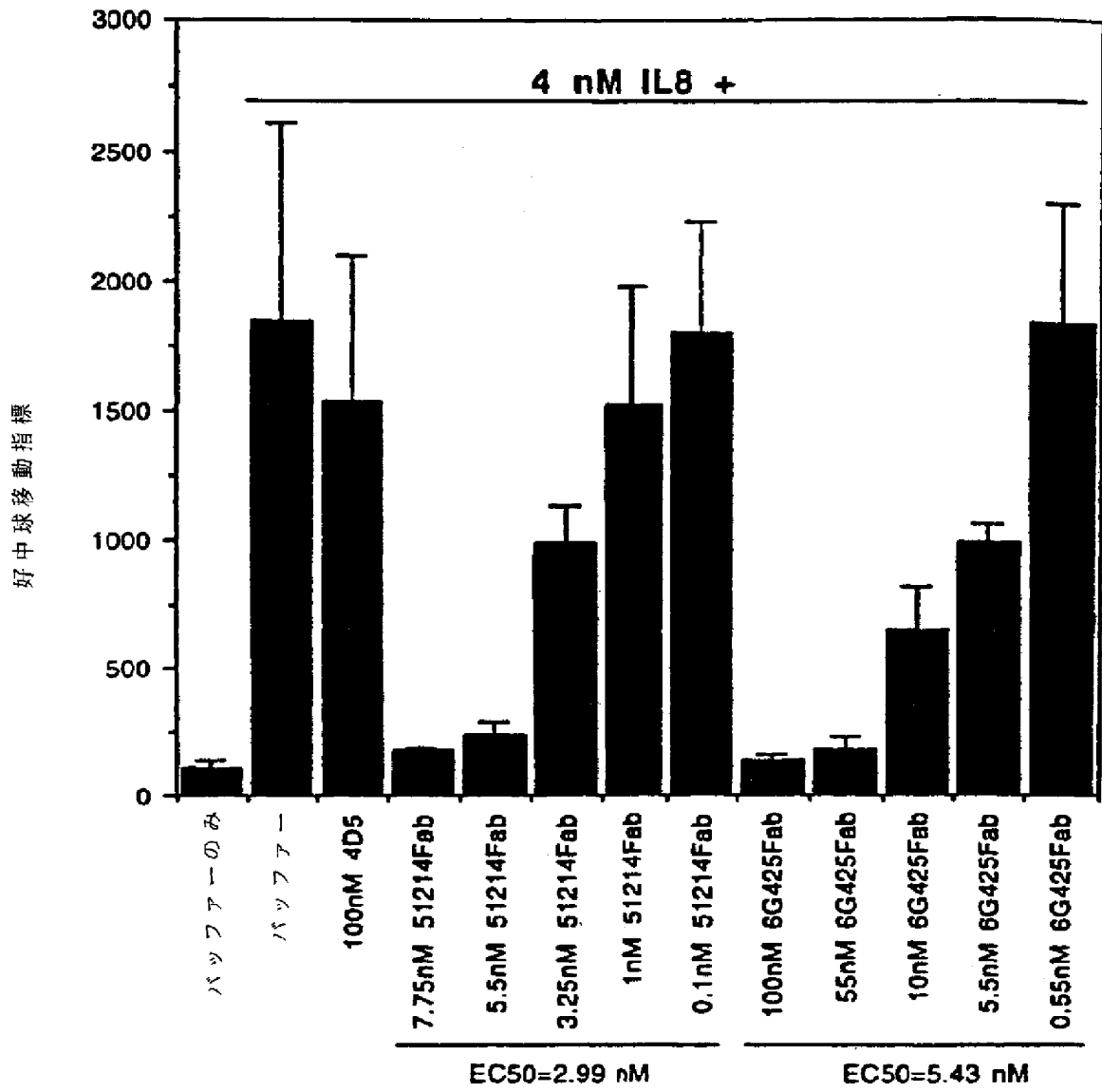


図 6

【図7】

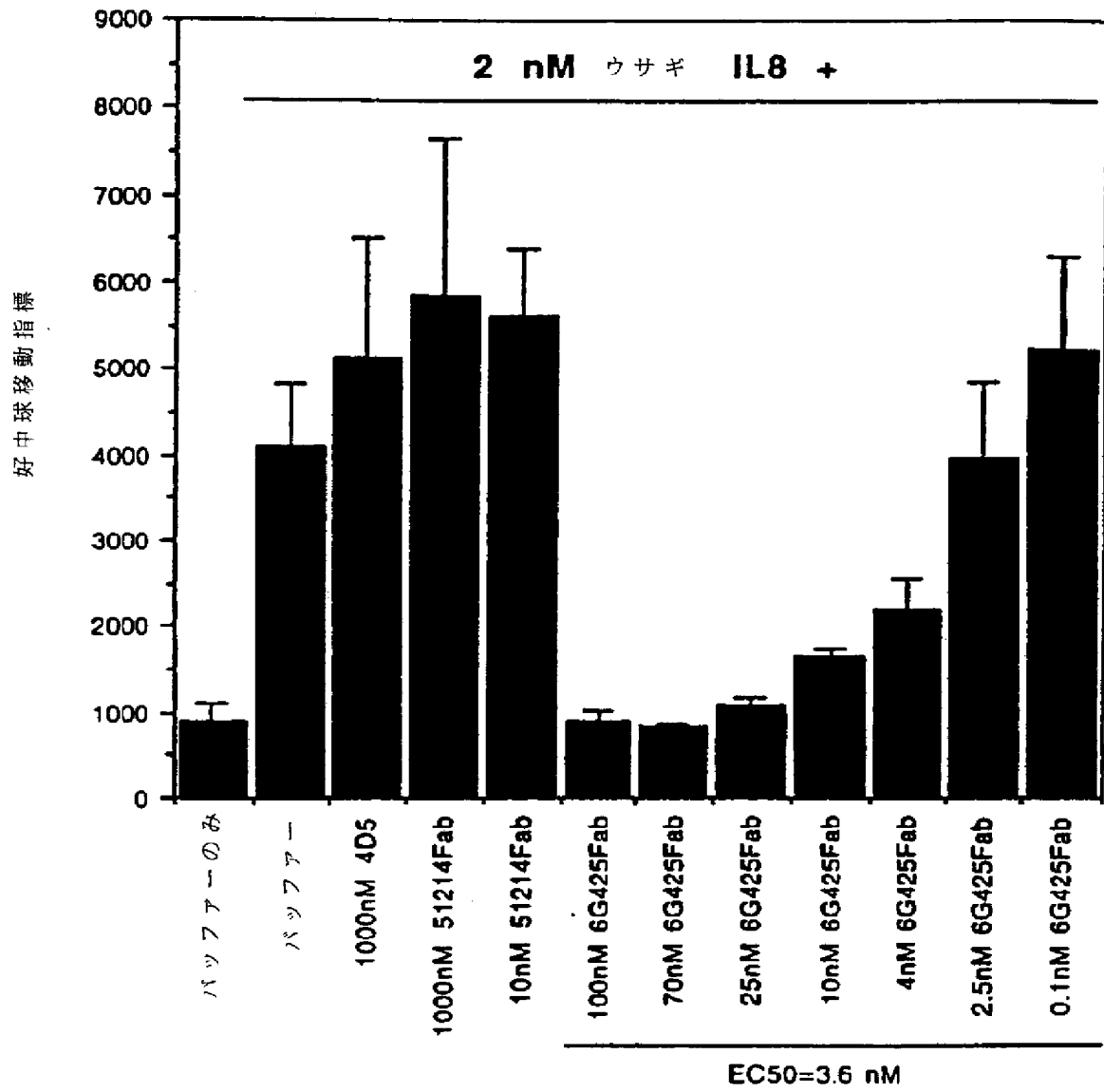


図 7

【図8】

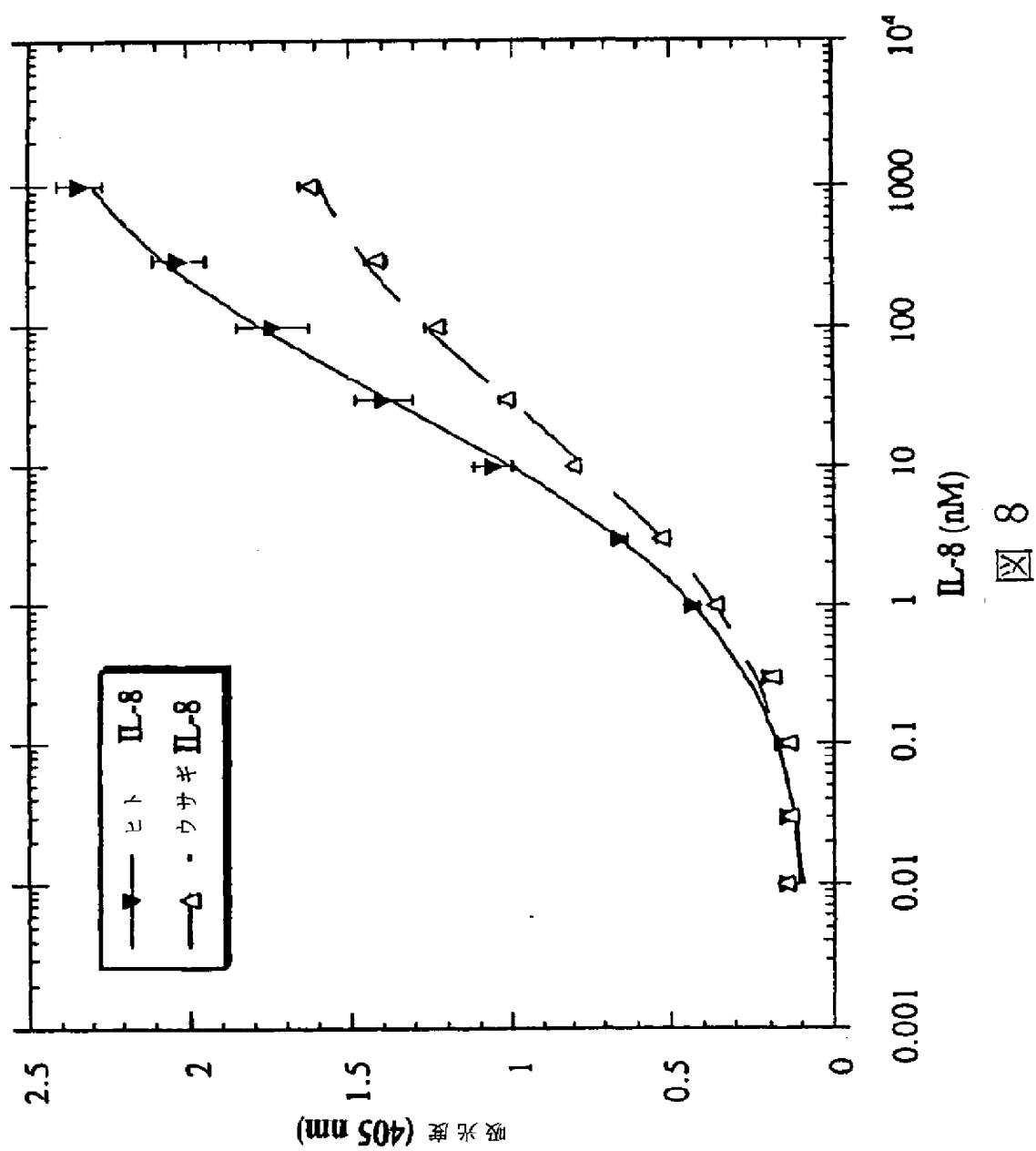


図 8

【図9】

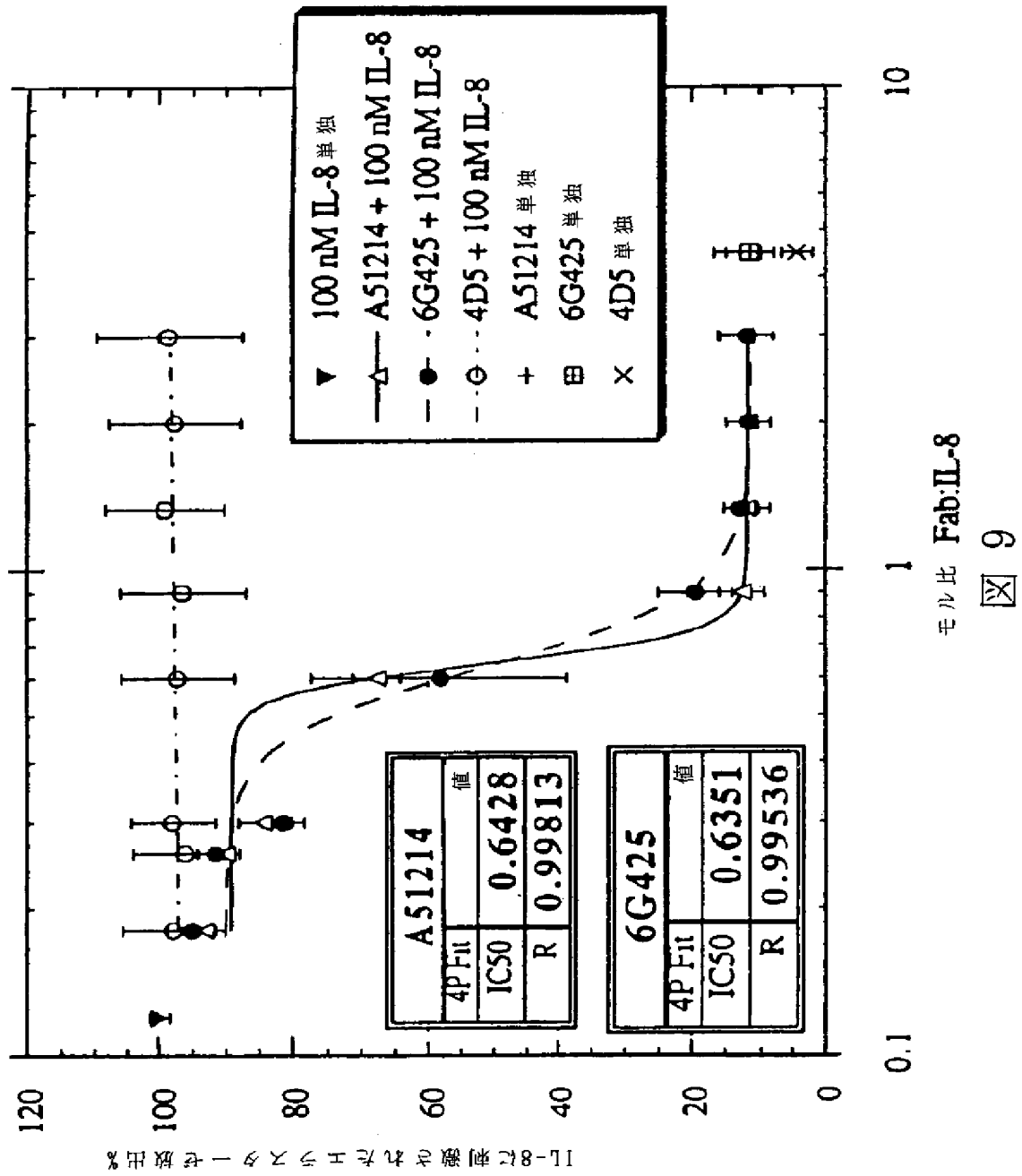
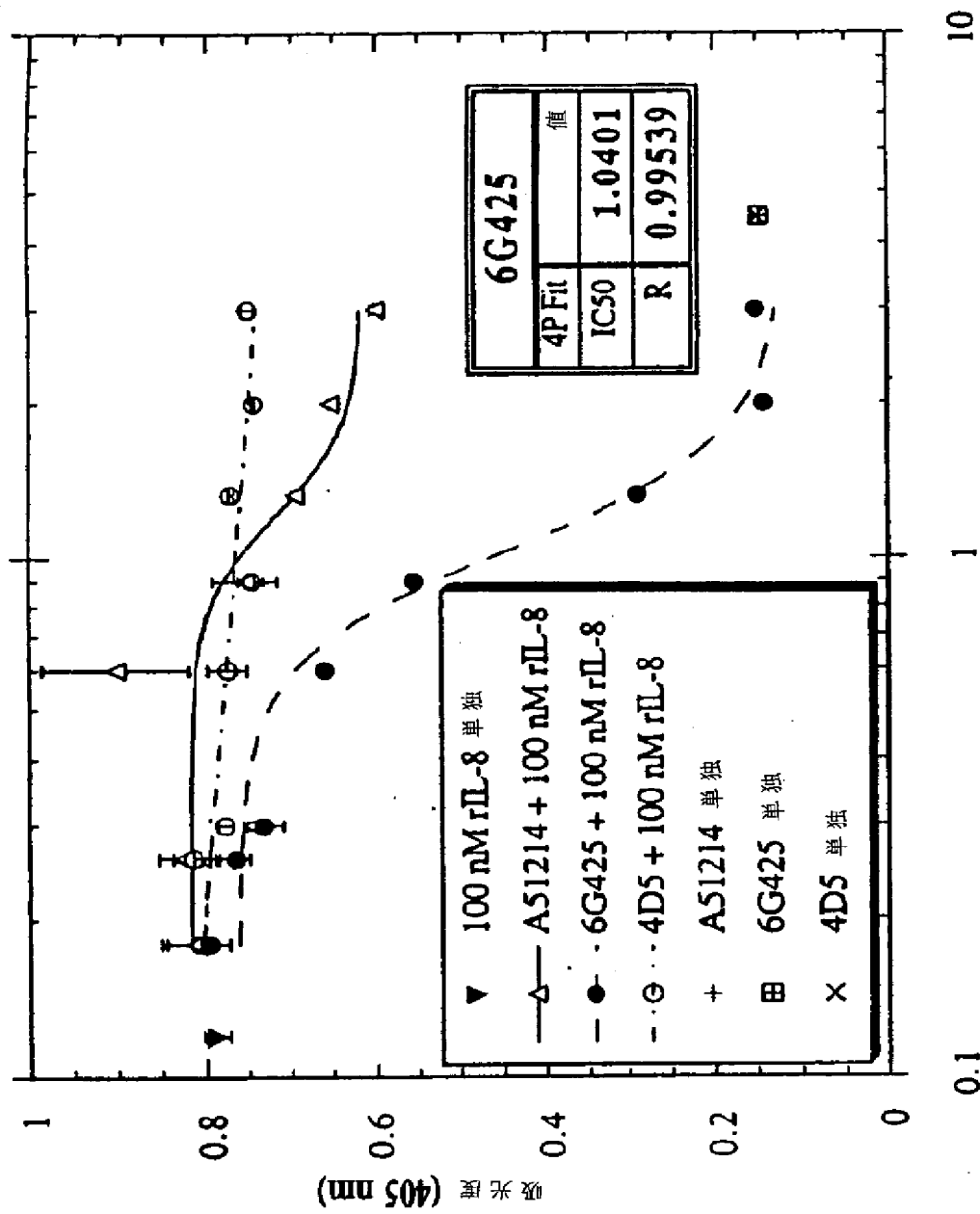


図9

【図10】



モル比 Fab:rIL-8

【図10】

【図11】

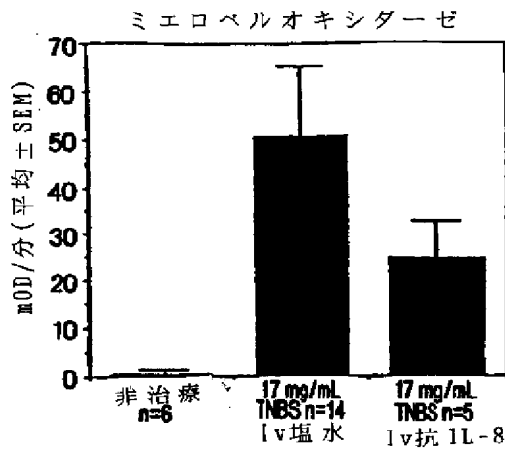


図 1 1 a

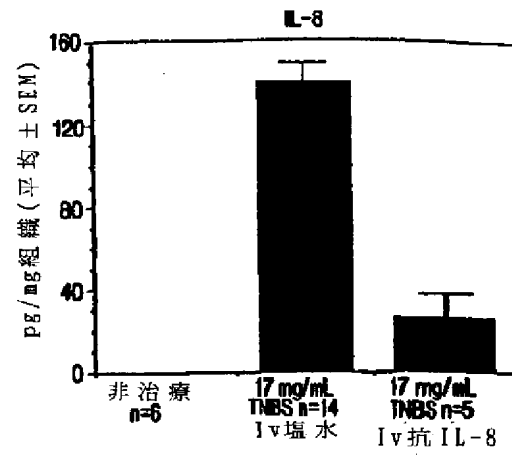


図 1 1 b

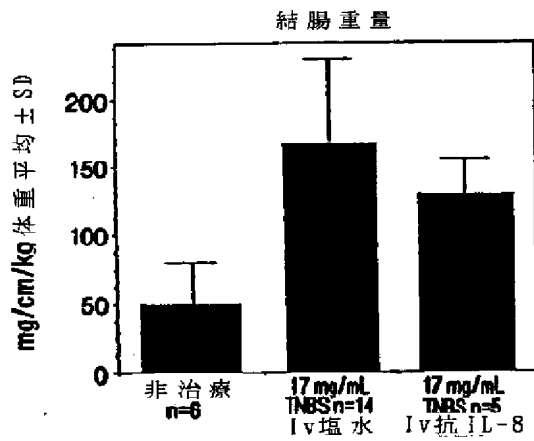


図 1 1 c

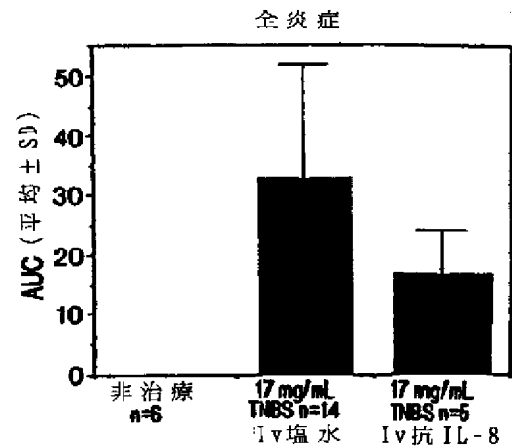


図 1 1 d

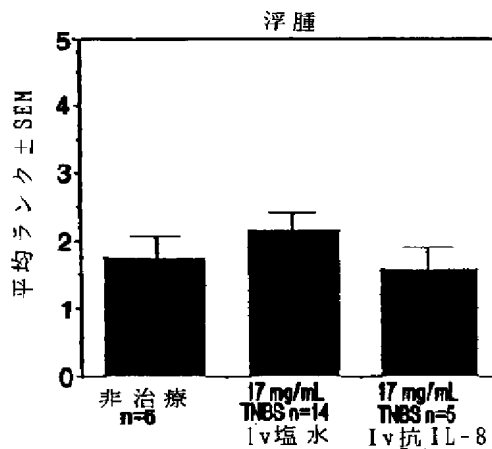


図 1 1 e

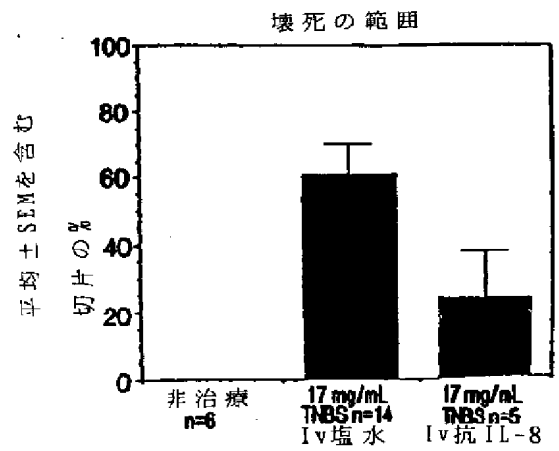


図 1 1 f

【図11】

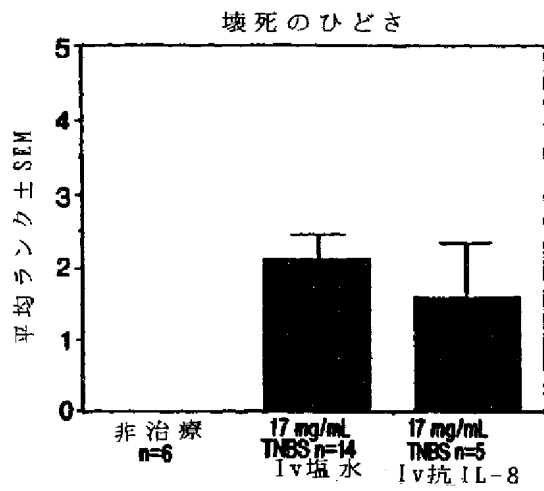


図 1 1 g

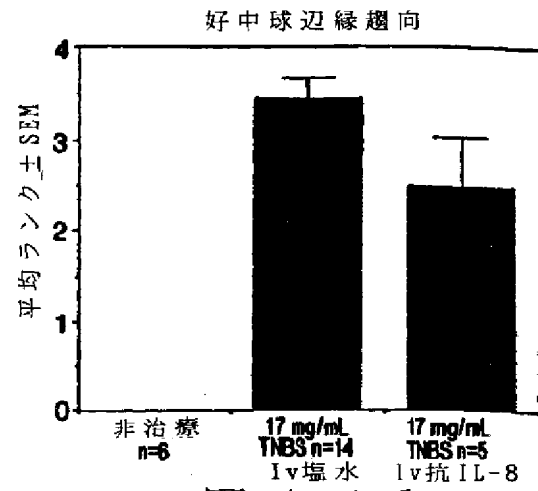


図 1 1 h

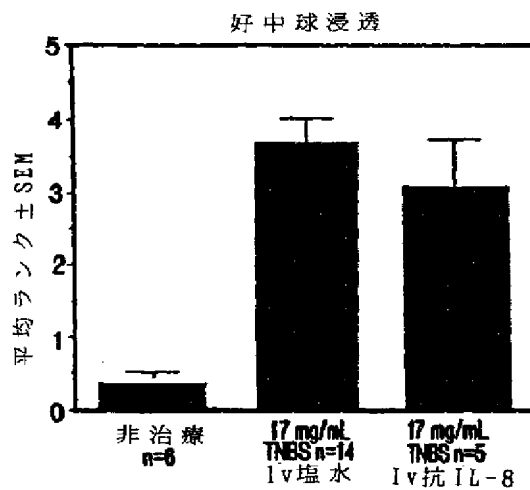


図 1 1 i

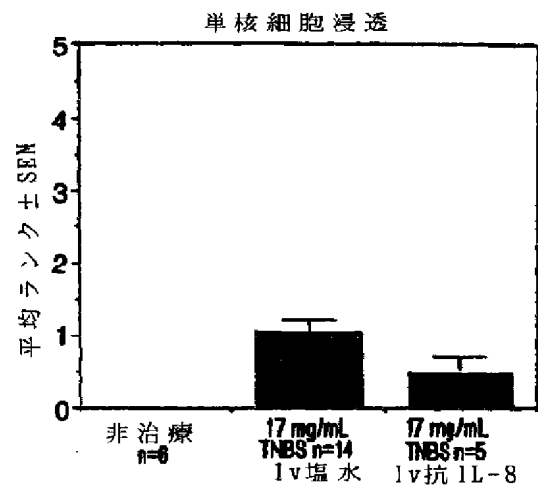


図 1 1 j

【図12】

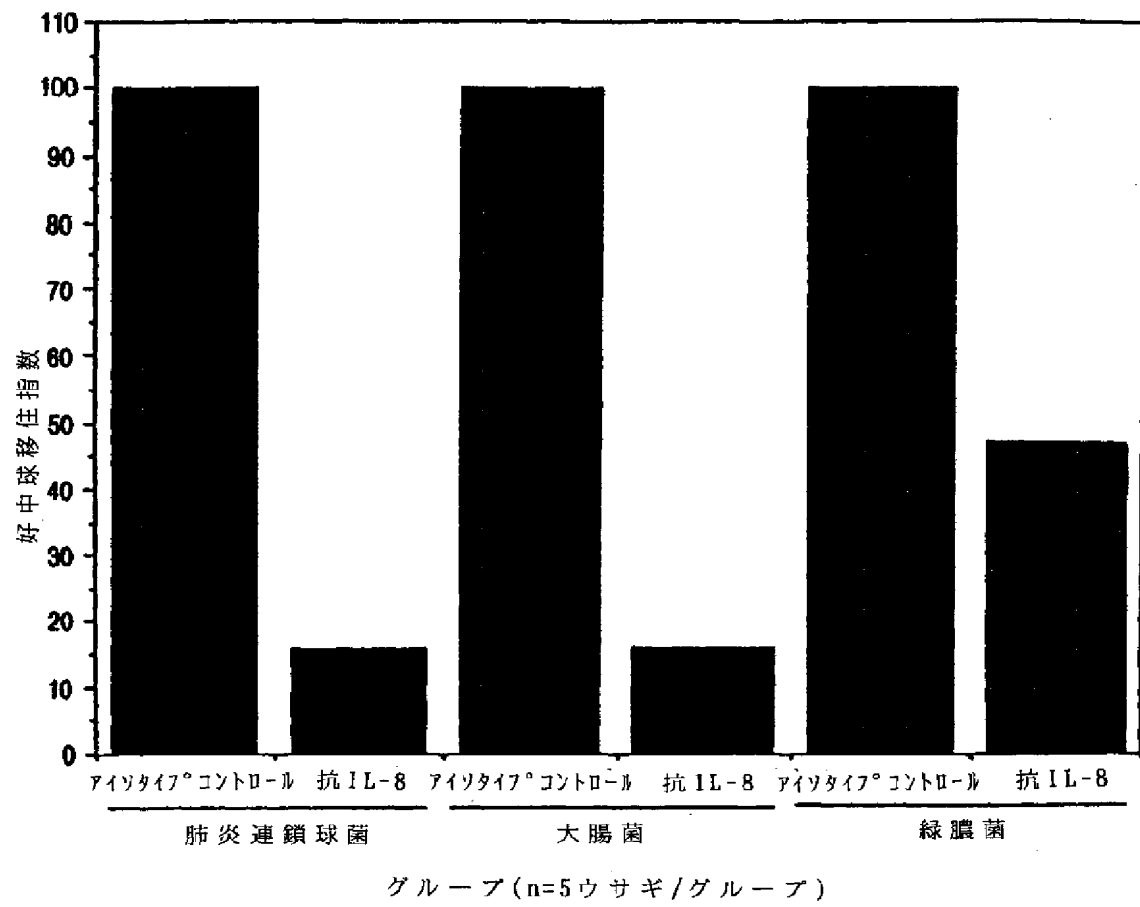


図 1 2

【図13】

L鎖プライマー

MKLC-1, 22mer

5' CAGTCCAACGTGTTTCAGGACGCC 3' (SEQ ID NO:1)

MKLC-2, 22mer

5' GTGCTGCTCATGCTGTAGGTGC 3' (SEQ ID NO:2)

MKLC-3, 23mer

5' GAAGTTGATGTCTTGTGAGTGGC 3' (SEQ ID NO:3)

H鎖プライマー

IGG2AC-1, 24mer

5' GCATCCTAGAGTCACCGAGGAGCC 3' (SEQ ID NO:4)

IGG2AC-2, 22mer

5' CACTGGCTCAGGGAAATAACCC 3' (SEQ ID NO:5)

IGG2AC-3, 22mer

5' GGAGAGCTGGGAAGGTGTGCAC 3' (SEQ ID NO:6)

図 13

【図14】

L鎖正プライマー

SL001A-2 35 mer

5' ACAAACGCGTACGCT GACATCGTCATGACCCAGTC 3' (SEQ ID NO:7)

T T T (SEQ ID NO:8)

A (SEQ ID NO:9)

L鎖逆プライマー

SL001B 37 mer

5' GCTCTTCGAATG GTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC 3' (SEQ ID NO:10)

図 14

【図15】

H鎖正プライマー

SL002B 39 mer

5' CGATGGGCCCCG ATAGACCGATGGGGCTGTTGTTTGGC 3' (SEQ ID NO:11)
 T C (SEQ ID NO:12)
 G (SEQ ID NO:13)
 A (SEQ ID NO:14)

H鎖逆プライマー

SL002B 39-MER

5' CGATGGGCCCCG ATAGACCGATGGGGCTGTTGTTTGGC 3' (SEQ ID NO:15)
 T (SEQ ID NO:16)
 A (SEQ ID NO:17)
 G (SEQ ID NO:18)

図 15

【 16 】

1 GACATTGTCA TGACACAGTC TCAAAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC
 CTGTAACAGT ACTGTGTGAG AGTTTTTAAG TACAGGTGTA GTCATCCTCT GTCCCAAGTCG
 1 D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S

61 GTCACCTGCA AGGCCAGTCA GAATGTGGGT ACTAATGTAG CCTGGTATCA ACAGAAACCA
 CAGTGGACGT TCCGGTCAGT CTTACACCCA TGATTACATC GGACCATAGT TGTCTTTGGT
 21 V T C K A S O N V G T N V A W Y Q Q K P
 * * * * *

CDR #1

121 GGGCAATCTC CTAAAGCACT GATTTACTCG TCATCCTACC GGTACAGTGG AGTCCCTGAT
 CCCGTTAGAG GATTTCGTGA CTAAATGAGC AGTAGGATGG CCATGTCACC TCAGGGACTA
 41 G Q S P K A L I Y S S S Y R Y S G V P D
 * * * * *

CDR #2

181 CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCCA TGTGCAGTCT
 GCGAAGTGTC CGTCACCTAG ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGGT ACACGTCAGA
 61 R F T G S G S G T D F T L T I S H V Q S
 241 GAAGACTTGG CAGACTATTT CTGTCAGCAA TATAACATCT ATCCTCTCAC GTTCGGTCCT
 CTTCTGAACC GTCTGATAAA GACAGTCGTT ATATTGTAGA TAGGAGAGTG CAAGCCAGGA
 81 E D L A D Y F C Q Q Y N I Y P L T F G P
 * * * * *

CDR #3

301 GGGACCAAGC TGGAGTTGAA ACGGGCTGAT GCTGCACCAC CAACTGTATC CATCTTCCCA
 CCCTGGTTCG ACCTCAACTT TGCCCGACTA CGACGTGGTG GTTGACATAG GTAGAAGGGT
 101 G T K L E L K R A D A A P P T V S I F P

BstBI

361 CCATTGAA (SEQ ID NO:19)

GGTAAGCTT

121 P F E (SEQ ID NO:20)

16

【 17 】

1 TTCTATTGCT ACAAACGCGT ACGCTGAGGT GCAGCTGGTG GAGTCTGGGG GAGGCTTAGT
 AAGATAACGA TGTTTGCGCA TCGGACTCCA CGTCGACCAC CTCAGACCCC CTCCGAATCA
 1 E V Q L V E S G G G L V

61 GCCGCCTGGA GGGTCCCTGA AACTCTCCTG TGCAGCCTCT GGATTTCATAT TCAGTAGTTA
 CGGCGGACCT CCCAGGGACT TTGAGAGGAC ACGTCGGAGA CCTAAGTATA AGTCATCAAT
 13 P P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y
 * *

CDR #1

121 TGGCATGTCT TGGGTTCGCC AGACTCCAGG CAAGAGCCTG GAGTTGGTCG CAACCATTA
 ACCGTACAGA ACCCAAGCGG TCTGAGGTCC GTTCTCGGAC CTCAACCAGC GTTGGTAATT
 33 G M S W V R Q T P G K S L E L V A T I N
 * * *

181 TAATAATGGT GATAGCACCT ATTATCCAGA CAGTGTGAAG GGCCGATTCA CCATCTCCCG
 ATTATTACCA CTATCGTGGA TAATAGGTCT GTCACACTTC CCGGCTAAGT GGTAGAGGGC
 53 N N G D S T Y Y P D S V K G R F T I S R
 * * * * *

CDR #2

241 AGACAATGCC AAGAACACCC TGTACCTGCA AATGAGCAGT CTGAAGTCTG AGGACACAGC
 TCTGTTACGG TTCTTGTTGG ACATGGACGT TTA CTGTCG GACTTCAGAC TCCTGTGTGCG
 73 D N A K N T L Y L Q N S S L K S E D T A

301 CATGTTTTAC TGTGCAAGAG CCCTCATTAG TTCGGCTACT TGGTTTGGTT ACTGGGGCCA
 GTACAAAATG ACACGTTCTC GGGAGTAATC AAGCCGATGA ACCAAACCAA TGACCCCGGT
 93 M F Y C A R A L I S S A T W F G Y W G Q
 * * * * *

CDR #3

361 AGGGACTCTG GTCAGTGTCT CTGCAGCCAA AACAACAGCC CCATCTGTCT
 TCCCTGAGAC CAGTGACAGA GACGTCGGTT TTGTTGTCGG GGTAGACAGA
 113 G T L V T V S A A K T T A P S V Y

Apa I

411 ATCCGGG (SEQ ID NO:21)

TAGGCCC

130 P (SEQ ID NO:22)

17

【図18】

VL.front 31-MER

5' ACAAACGCGTACGCTGATATCGTCATGACAG 3' (SEQ ID NO:23)
VL.rear 31-MER

5' GCAGCATCAGCTCTTCGAAGCTCCAGCTTGG 3' (SEQ ID NO:24)

VH.front.SPE 21-MER

5' CCACTAGTACGCAAGTTCACG 3' (SEQ ID NO:25)

VH.rear 33-MER

5' GATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGCAGAGACAGTG 3' (SEQ ID NO:26)

図 18

【图19】

```

1 ATGAAGAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTTCG TTTTTCCTAT TGCTACAAAC
TACTTCTTCT TATAGCGTAA AGAAGAACGT AGATACAAGC AAAAAAGATA ACGATGTTTG
-23 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N

61 GCGTACGCTG ATATCGTCAT GACACAGTCT CAAAAATTCA TGTCCACATC AGTAGGAGAC
CGCATGCGAC TATAGCAGTA CTGTGTCAGA GTTTTAAAGT ACAGGTGTAG TCATCCTCTG
-3 A Y A D I V M T Q S Q K F M S T S V G D

121 AGGGTCAGCG TCACCTGCAA GGCCAGTCAG AATGTGGGTA CTAATGTAGC CTGGTATCAA
TCCCAGTCGC AGTGGACGTT CCGGTCAGTC TTACACCCAT GATTACATCG GACCATAGTT
18 R V S V T C K A S O N V G T N V A W Y Q
      * * * * *
      CDR #1

181 CAGAAACCAG GGCAATCTCC TAAAGCACTG ATTTACTCGT CATCCTACCG GTACAGTGGA
GTCTTTGGTC CCGTTAGAGG ATTTCTGTGAC TAAATGAGCA GTAGGATGGC CATGTCACCT
38 Q K P G Q S P K A L I Y S S S Y R Y S G
      * * * * *
      CDR #2

241 GTCCCTGATC GCTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC CATCAGCCAT
CAGGGACTAG CGAAGTGTCC GTCACCTAGA CCGTGTCTAA AGTGAGAGTG GTAGTCGGTA
58 V P D R F T G S G S G T D F T L T I S H

301 GTGCAGTCTG AAGACTTGGC AGACTATTTC TGTCAGCAAT ATAACATCTA TCCTCTCACG
CACGTCAGAC TTCTGAACCG TCTGATAAAG ACAGTCGTTA TATTGTAGAT AGGAGAGTGC
78 V Q S E D L A D Y F C Q Q Y N I Y P L T
      * * * * *
      CDR #3

      BstBI
361 TTCGGTCTCTG GGACCAAGCT GGAGCTTCGA AGAGCTGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC
AAGCCAGGAC CCTGGTTCGA CCTCGAAGCT TCTCGACACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG
98 F G P G T K L E L R R A V A A P S V F I

421 TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTCTCT CTGTGTGTGT CCTGCTGAAT
AAGGCGGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA CCTTGACGAA GACAACACAC GGACGACTTA
118 F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N

481 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAAGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT
TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC TATTGCGGGA GGTTAGCCCA
138 N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G

541 AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC
TTGAGGGTCC TCTCACAGTG TCTCGTCTCG TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTG
158 N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S

601 ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCCTG CGAAGTCACC
TGGGACTGCG ACTCGTTTCG TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC GCTTCAGTGG
178 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T

661 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG
GTAGTCCCGG ACTCGAGCGG GCAGTGTTTC TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC
198 H Q G L S S P V T K S F N R G E C

711 TTAA (SEQ ID NO:27)
AATT
216 O (SEQ ID NO:28)

```

【 20 】

1 ATGAAAAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTTCG TTTTCTCTAT TGCTACAAAC
TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGAACGT AGATACAAGC AAAAAAGATA ACGATGTTTG
-23 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N

61 GCGTACGCTG AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT TAGTGCCGCC TGGAGGGTCC
CGCATGCGAC TCCACGTCGA CCACCTCAGA CCCCCTCCGA ATCACGGCGG ACCTCCCAGG
-3 A Y A E V Q L V E S G G G L V P P G G S

121 CTGAAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTCT ATATTCAGTA GTTATGGCAT GTCTTGGGTT
GACTTTGAGA GGACACGTCG GAGACCTAAG TATAAGTCAT CAATACCGTA CAGAACCCAA
18 L K L S C A A S G F I F S S Y G M S W V
* * * *

CDR #1

181 CGCCAGACTC CAGGCAAGAG CCTGGAGTTG GTCCGAACCA TTAATAATAA TGGTGATAGC
GCGGTCTGAG GTCCGTTCTC GGACCTCAAC CAGCGTTGGT AATTATTATT ACCACTATCG
38 R Q T P G K S L E L V A T I N N N G D S
* * * *

241 ACCTATTATC CAGACAGTGT GAAGGGCCGA TTCACCATCT CCCGAGACAA TGCCAAGAAC
TGATAATAG GTCTGTCACA CTTCCCGGCT AAGTGGTAGA GGGCTCTGTT ACGGTTCTTG
58 T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A K N
* * * *

CDR #2

301 ACCCTGTACC TGCAAATGAG CAGTCTGAAG TCTGAGGACA CAGCCATGTT TTAGTGTGCA
TGGGACATGG ACGTTTACTC GTCAGACTTC AGACTCCTGT GTCGGTACAA AATGACACGT
78 T L Y L Q M S S L K S E D T A M F Y C A

361 AGAGCCCTCA TTAGTTCGGC TACTTGGTTT GGTACTGCGG GCCAAGGGAC TCTGGTCACT
TCTCGGGAGT AATCAAGCCG ATGAACCAAA CCAATGACCC CGGTTCCCTG AGACCAGTGA
98 R A L I S S A T W F G Y W G Q G T L V T
* * * *

CDR #3

ApaI

421 GTCTCTGCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCCCC TGGCACCCCTC CTCCAAGAGC
CAGAGACGTC GGAGGTGGTT CCCGGGTAGC CAGAAGGGGG ACCGTGGGAG GAGGTTCTCG
118 V S A A S T K G P S V F P L A P S S K S

481 ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG
TGGAGACCCC CGTGTGCGCG GGACCCGACG GACCAGTTCC TGATGAAGGG GCTTGGCCAC
138 T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V

541 ACGGTGTCTG GAAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTTA
TGCCACAGCA CCTTGAGTCC GCGGGACTGG TCGCCGACG TGTGGAAGGG CCGACAGGAT
158 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L

601 CAGTCTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG CAGCTTGGGC
GTCAGGAGTC CTGAGATGAG GGAGTCTGTC CACCACTGGC ACGGGAGGTC GTCGAACCCG
178 Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G

661 ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAA
TGGGTCTGGA TGTAAGACGT GCACTTAGTG TTCGGGTCGT TGTGGTTCCA CCTGTTCTTT
198 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K

721 GTTGAAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACACAC ACATGA

(SEQ ID NO: 29)

218 V E P K S C D K T H T O

SEQ ID NO: 30)

【 20 】

【図21】

L鎖プライマー

MKLC-1, 22mer

5' CAGTCCAACCTGTTTCAGGACGCC 3' (SEQ ID NO:31)

MKLC-2, 22mer

5' GTGCTGCTCATGCTGTAGGTGC 3' (SEQ ID NO:32)

MKLC-3, 23mer

5' GAAGTTGATGTCTTGTGAGTGGC 3' (SEQ ID NO:33)

H鎖プライマー

IGG2AC-1, 24mer

5' GCATCCTAGAGTCACCGAGGAGCC 3' (SEQ ID NO:34)

IGG2AC-2, 22mer

5' CACTGGCTCAGGGAAATAACCC 3' (SEQ ID NO:35)

IGG2AC-3, 22mer

5' GGAGAGCTGGGAAGGTGTGCAC 3' (SEQ ID NO:36)

図 2 1

【図22】

L鎖正プライマー

6G4.light.Nsi 36-MER

5' CCAATGCATACGCT GAC ATC GTG ATG ACC CAG ACC CC 3' (SEQ ID NO:37)

T T T T (SEQ ID NO:38)

A A (SEQ ID NO:39)

L鎖逆プライマー

6G4.light.Mun 35-MER

5' AGA TGT CAA TTG CTC ACT GGA TGG TGG GAA GAT GG 3' (SEQ ID NO:40)

図 2 2

【図23】

H鎖正プライマー

6G4.heavy.Mlu 32-MER

5' CAAACGCGTACGCT GAG ATC CAG CTG CAG CAG 3' (SEQ ID NO:41)
 T C (SEQ ID NO:42)

H鎖逆プライマー

SL002B 39-MER

5' CGATGGGCCCCG ATAGACCGATGGGGCTGTTGTTTTGGC 3' (SEQ ID NO:43)
 T (SEQ ID NO:44)
 A (SEQ ID NO:45)
 G (SEQ ID NO:46)

図 23

【 24 】

70 G ATATCGTGAT GACACAGACA CCACTCTCCC TGCCTGTCAG TCTTGGAGAT
 C TATAGCACTA CTGTGTCTGT GGTGAGAGGG ACGGACAGTC AGAACCTCTA
 1 D I V M T Q T P L S L P V S L G D

121 CAGGCCTCCA TCTCTTGCA G ATCTAGTCAG AGCCTTGTAC ACGGTATTGG AAACACCTAT
 GTCCGGAGGT AGAGAACGTC TAGATCAGTC TCGGAACATG TGCCATAACC TTTGTGGATA
 18 Q A S I S C R S S O S L V H G I G N T Y
 * * * * *

CDR #1

181 TTACATTGGT ACCTGCAGAA GCCAGGCCAG TCTCCAAAGC TCCTGATCTA CAAAGTTTCC
 AATGTAACCA TGGACGTCTT CGGTCCGGTC AGAGGTTTCG AGGACTAGAT GTTTCAAAGG
 38 L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S
 * * * * *

CDR #2

241 AACCGATTTT CTGGGGTCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTCACA
 TTGGCTAAAA GACCCCAGGG TCTGTCCAAG TCACCGTCAC CTAGTCCCTG TCTAAAGTGT
 58 N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T
 * * * * *

301 CTCAGGATCA GCAGAGTGGG GGCTGAGGAT CTGGGACTTT ATTTCTGCTC TCAAAGTACA
 GAGTCCTAGT CGTCTCACCT CCGACTCCTA GACCCTGAAA TAAAGACGAG AGTTTCATGT
 78 L R I S R V E A E D L G L Y F C S Q S T
 * * * * *

CDR #3

361 CATGTTCCGC TCACGTTCCG TGCTGGGACC AAGCTGGAGC TGAAACGGGC TGATGCTGCA
 GTACAAGGCG AGTGCAAGCC ACGACCCTGG TTCGACCTCG ACTTTGCCCG ACTACGACGT
 98 H V P L T F G A G T K L E L K R A D A A
 * * * * *

MunI

421 CCAACTGTAT CCATCTTCCC ACCATCCAGT GAGCAATTGA (SEQ ID NO: 47)

GGTTGACATA GGTAGAAGGG TGGTAGGTCA CTCGTTAACT (SEQ ID NO: 48)

118 P T V S I F P P S S E Q L K

【 24 】

【 25 】

```

70 G AGATTCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGATGAAGCC TGGGGCTTCA
   C TCTAAGTCGA CGTCGTCAGA CCTGGACTCG ACTACTTCGG ACCCCGAAGT
18 E I Q L Q Q S G P E L M K P G A S

121 GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAT TCATTCAGTA GCCACTACAT GCACTGGGTG
   .CACTTCTATA GGACGTTCCG AAGACCAATA AGTAAGTCAT CGGTGATGTA CGTGACCCAC
18 V K I S C K A S G Y S F S S H Y M H W V
                      * * * * *

                                CDR #1

181 AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGCTACA TTGATCCTTC CAATGGTGAA
   TTCGTCTCGG TACCTTTCTC GGAACTCACC TAACCGATGT AACTAGGAAG GTTACCACTT
38 K Q S H G K S L E W I G Y I D P S N G E
                      * * * * *

                                CDR #2

241 ACTACTTACA ACCAGAAATT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGACAC ATCTTCCAGC
   TGATGAATGT TGGTCTTTAA GTTCCCGTTC CGGTGTAACT GACATCTGTG TAGAAGGTCC
58 T T Y N O K F K G K A T L T V D T S S S
   * * * * *

301 ACAGCCAACG TGCATCTCAG CAGCCTGACA TCTGATGACT CTGCAGTCTA TTTCTGTGCA
   TGTCGGTTGC ACGTAGAGTC GTCGGACTGT AGACTACTGA GACGTCAGAT AAAGACACGT
78 T A N V H L S S L T S D D S A V Y F C A

361 AGAGGGGACT ATAGATACAA CGGCGACTGG TTTTTCGATG TCTGGGGCGC AGGGACCACG
   TCTCCCCTGA TATCTATGTT GCCGCTGACC AAAAAGCTAC AGACCCCGCG TCCCTGGTGC
98 R G D Y R Y N G D W F F D V W G A G T T
   * * * * *

                                CDR #3

      BstEII                                     ApaI
421 GTCACCGTCT CCTCCGCCAA AACCGACAGC CCCATCGGTC TATCCGGGCT
   CAGTGCCAGA GGAGGCGGAT TTGGCTGTCT GGGTAGCCAG ATAGGCCCGG
118 V T V S S A K T D S P I G L S G P

471 CATC (SEQ ID NO:49)
   GTAG
135 I (SEQ ID NO:50)

```

【 25 】

【図26】

5' CTTGGTGGAGGCGGAGGAGACG 3' (SEQ ID NO:51)

6G425VLに対するミュータジェネシスプライマー

DS/VF 38MER

5' GAAACGGGCTGTTGCTGCACCAACTGTATTCATCTTCC 3' (SEQ ID NO:52)

SYN.BstEII 31 MER

5' GTCACCGTCT CCTCCGCCTC CACCAAGGGC C 3' (SEQ ID NO:53)

SYN.Apa 22 MER

5' CTTGGTGGAGGCGGAGGAGACG 3' (SEQ ID NO:54)

図 26

【图27】

```

1 ATGAAGAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTTCG TTTTCTCTAT TGCTACAAAT
TACTTCTTCT TATAGCGTAA AGAAGAACGT AGATACAAGC AAAAAAGATA ACGATGTTTA
-23 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N

61 GCATACGCTG ATATCGTGAT GACACAGACA CCACTCTCCC TGCCTGTCAG TCTTGAGAT
CGTATGCGAC TATAGCACTA CTGTGTCTGT GGTGAGAGGG ACGGACAGTC AGAACCTCTA
-3 A Y A D I V M T Q T P L S L P V S L G D

121 CAGGCCTCCA TCTCTTGCAG ATCTAGTCAG AGCCTTGTCAC ACGGTATTGG AAACACCTAT
GTCCGGAGGT AGAGAACGTC TAGATCAGTC TCGGAACATG TGCCATAACC TTTGTGGATA
18 Q A S I S C R S S O S L V H G I G N T Y
      * * * * *
      CDR #1

181 TTACATTGGT ACCTGCAGAA GCCAGGCCAG TCTCCAAAGC TCCTGATCTA CAAAGTTTCC
AATGTAACCA TGGACGTCTT CGGTCCGGTC AGAGGTTTCG AGGACTAGAT GTTTCAAAGG
38 L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S
      * * * * *
      CDR #2

241 AACCGATTTT CTGGGGTCCC AGACAGGTTC AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTTACA
TTGGCTAAAA GACCCCAGGG TCTGTCCAAG TCACCGTCAC CTAGTCCCTG TCTAAAGTGT
58 N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T
      * * * * *

301 CTCAGGATCA GCAGAGTGGA GGCTGAGGAT CTGGGACTTT ATTTCTGCTC TCAAAGTACA
GAGTCCTAGT CGTCTCACCT CCGACTCCTA GACCCTGAAA TAAAGACGAG AGTTTCATGT
78 L R I S R V E A E D L G L Y F C S Q S T
      * * * * *
      CDR #3

361 CATGTTCCGC TCACGTTCCG TGCTGGGACC AAGCTGGAGC TGAAACGGGC TGTTGCTGCA
GTACAAGGCG AGTGCAAGCC ACGACCCTGG TTCGACCTCG ACTTTGCCCG ACAACGACGT
96 H V P L T F G A G T K L E L K R A V A A
      * * * * *

421 CCAACTGTAT TCATCTTCCC ACCATCCAGT GAGCAATTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT
GGTTGACATA AGTAGAAGGG TGGTAGGTCA CTCGPTAACT TTAGACCTTG ACGGAGACAA
118 P T V F I F P P S S E Q L K S G T A S V

481 GTGTGCCTGC TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC
CACACGGACG ACTTATTGAA GATAGGGTCT CTCCGGTTTC ATGTCACCTT CCACCTATTG
138 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N

541 GCCCTCCAAT CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
CGGGAGGTTA GCCCATTGAG GGTCTCTCTA CAGTGTCTCG TCCTGTCTGT CCTGTCTGTG
158 A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T

601 TACAGCCTCA GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC
ATGTCGGAGT CGTCGTGGGA CTGCGACTCG TTTCGTCTGA TGCTCTTTGT GTTTCAGATG
178 Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y

661 GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA
CGGACGCTTC AGTGGGTAGT CCGGACTCG AGCGGGCAGT GTTTCCTCGAA GTTGTCCCTT
198 A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G

721 GAGTGTTAA (SEQ ID NO:55)
CTCACAATT
218 E C O (SEQ ID NO:56)

```

图 27

【图28】

```

1 ATGAAAAAGA ATATCGCATT TCTTCTTGCA TCTATGTTTCG TTTTTCCTAT TGCTACAAAC
TACTTTTCT TATAGCGTAA AGAAGAACGT AGATACAAGC AAAAAAGATA ACGATGTTTG
-23 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N

61 GCGTACGCTG AGATTTCAGCT GCAGCAGTCT GGACCTGAGC TGATGAAGCC TGGGGCTTCA
CGCATGCGAC TCTAAGTCGA CGTCGTCAGA CCTGGACTCG ACTACTTCGG ACCCCGAAGT
-3 A Y A E I Q L Q Q S G P E L M K P G A S

121 GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAT TCATTTCAGTA GCCACTACAT GCACTGGGTG
CACTTCTATA GGACGTTCCG AAGACCAATA AGTAAGTCAT CGGTGATGTA CGTGACCCAC
18 V K I S C K A S G Y S E S S H Y M H W V

```

CDR #1

```

181 AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGCTACA TTGATCCTTC CAATGGTGAA
TTCGTCTCGG TACCTTTCTC GGAACCTCACC TAACCGATGT AACTAGGAAG GTTACCACCTT
38 K Q S H G K S L E W I G Y I D P S N G E

```

CDR #2

```

241 ACTACTTACA ACCAGAAATT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGACAC ATCTTCCAGC
TGATGAATGT TGGTCTTTAA GTTCCCGTTC CGGTGTAAGT GACATCTGTG TAGAAGGTCTG
58 T T Y N D K F K G K A T L T V D T S S S

```

```

301 ACAGCCAAACG TGCATCTCAG CAGCCTGACA TCTGATGACT CTGCAGTCTA TTTCTGTGCA
TGTCGGTTGC ACGTAGAGTC GTCGGACTGT AGACTACTGA GACGTCAGAT AAAGACACGT
78 T A N V H L S S L T S D D S A V Y F C A

```

```

361 AGAGGGGACT ATAGATACAA CGGCGACTGG TTTTTCGATG TCTGGGGCGC AGGGACCACG
TCTCCCTGTA TATCTATGTT GCCGCTGACC AAAAAGCTAC AGACCCCGCG TCCCTGGTGC
98 R G D Y R Y N G D W F F D V W G A G T T

```

CDR #3

```

421 GTCACCGTCT CCTCCGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC ACCCTCCTCC
CAGTGGCAGA GGAGGCGGAG GTGGTTCCCG GGTAGCCAGA AGGGGGACCG TGGGAGGAGG
118 V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S

```

```

481 AAGAGCACCT CTGGGGGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA
TTCTCGTGGA GACCCCGTG TCGCCGGGAC CCGACGGACC AGTTCCTGAT GAAGGGGCTT
138 K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E

```

```

541 CCGGTGACGG TGTCTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT
GGCCACTGCC ACAGCACCTT GAGTCCGCGG GACTGGTCCG CGCACGTGTG GAAGGGCCGA
158 P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A

```

```

601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC
CAGGATGTCA GGAGTCCTGA GATGAGGGAG TCGTCGCACC ACTGGCACGG GAGGTCTGTCG
178 V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S

```

```

661 TTGGGCACCC AGACCTACAT CTGCAACGTG AATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
AACCCGTGGG TCTGGATGTA GACGTTGCAC TTAGTGTTTC GGTCTGTTGT GTTCCACCTG
198 L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D

```

```

721 AAGAAAGTTG AGCCCAAATC TTGTGACAAA ACTCACACAT GA (SEQ ID NO:57)
TTCTTTCAAC TCGGGTTTAG AACACTGTTT TGAGTGTGTA CT

```

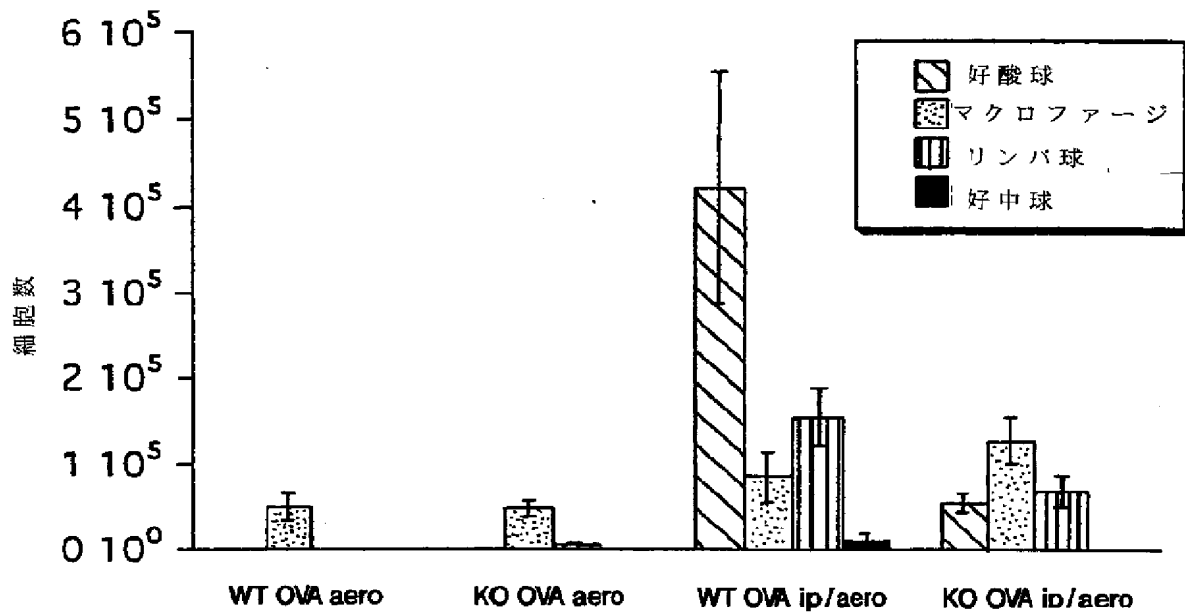
```

218 K K V E P K S C D K T H T O (SEQ ID NO:58)

```

图 28

【図29】



mouse #823 grp4 不含 (BAL細胞不明瞭)
 mouse #780 不含 (腎臓clst)
 mouse #833 grp3 含 (ova-IgEなし)
 mouse #821 grp2 不含 (CBC中に凝血)

図 2 9

【図30】

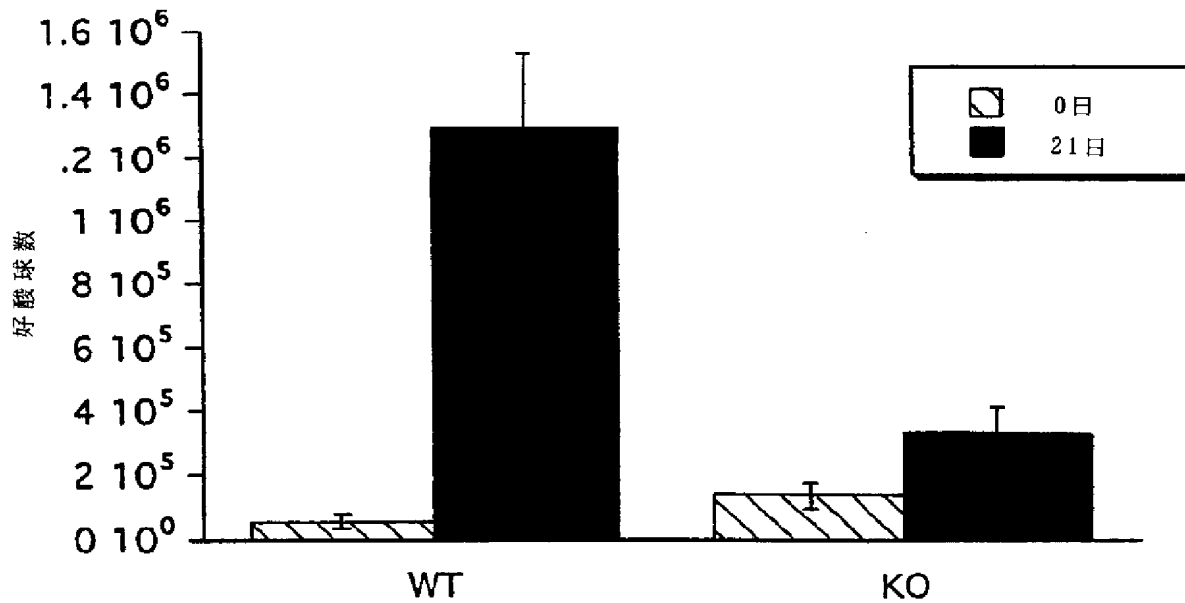


図 3 0

【図31】

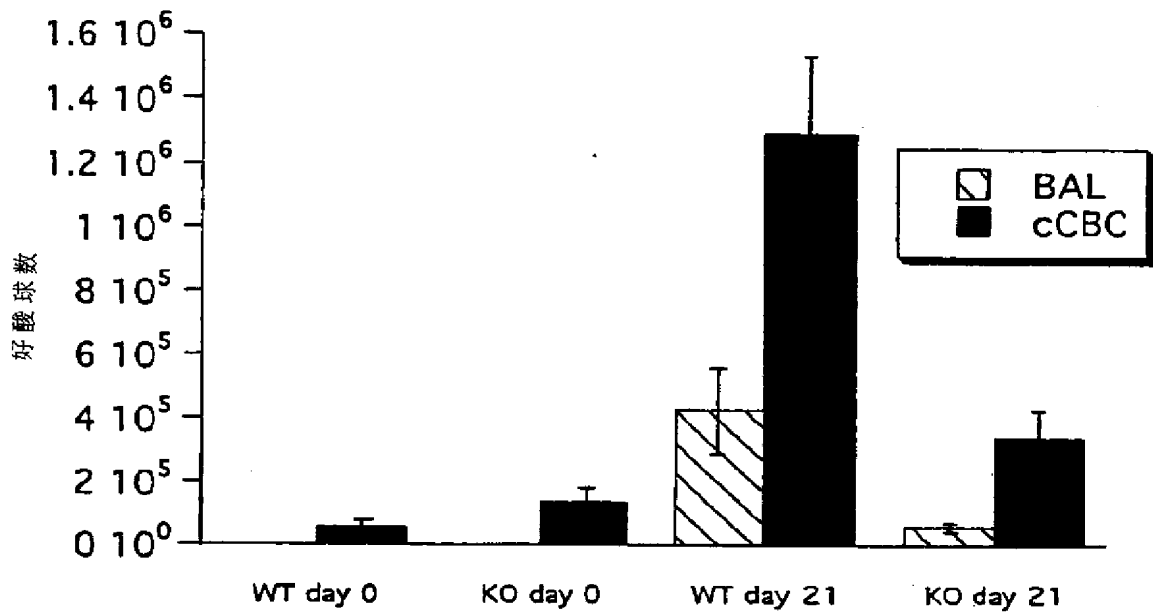


図 3 1

【図32】

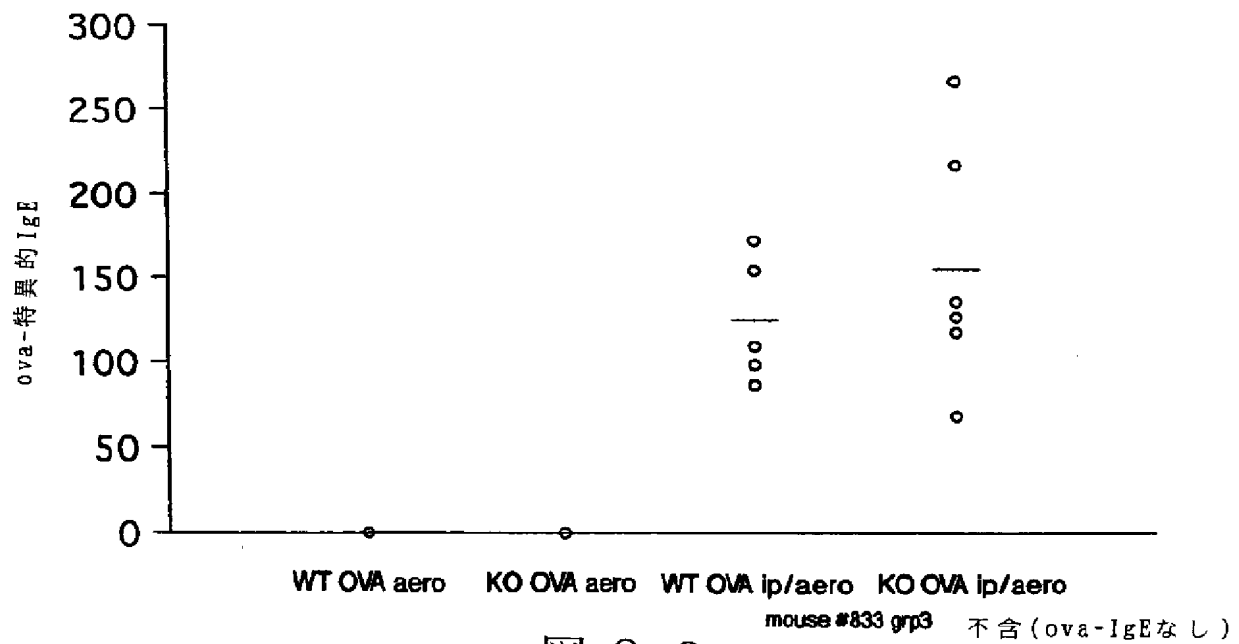


図 3 2

【图33】



图 3 3

【图34】



图 3 4

【图35】



图 3 5

【图36】

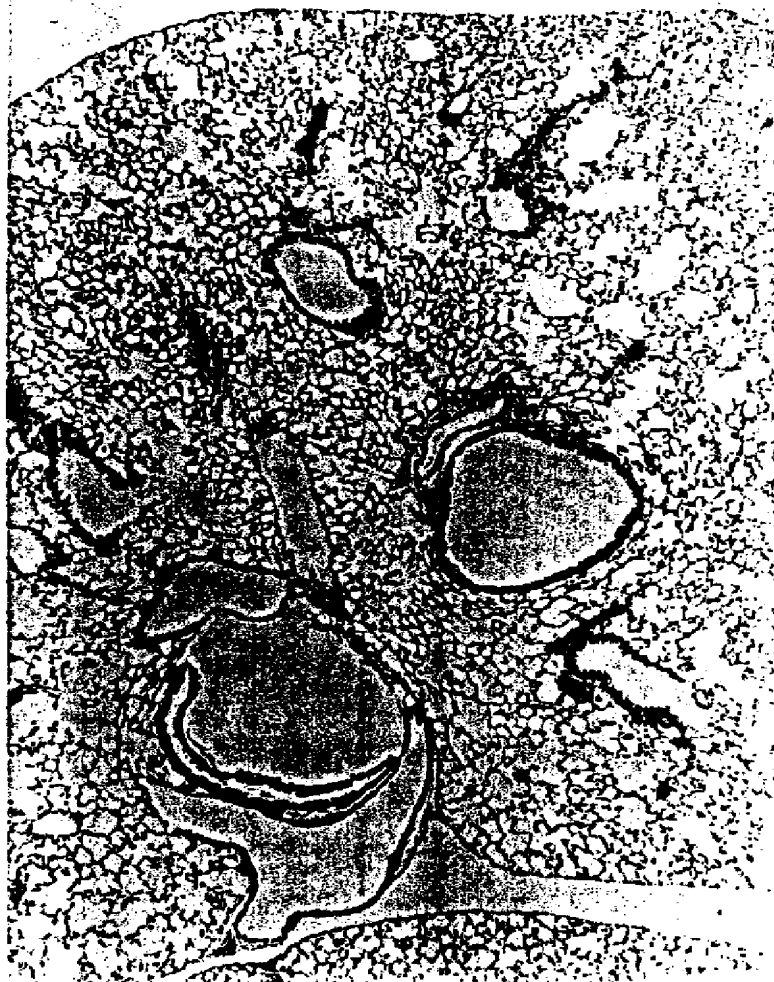


图 3 6

【图37】



图 3 7

【图38】



图 3 8

【図39】

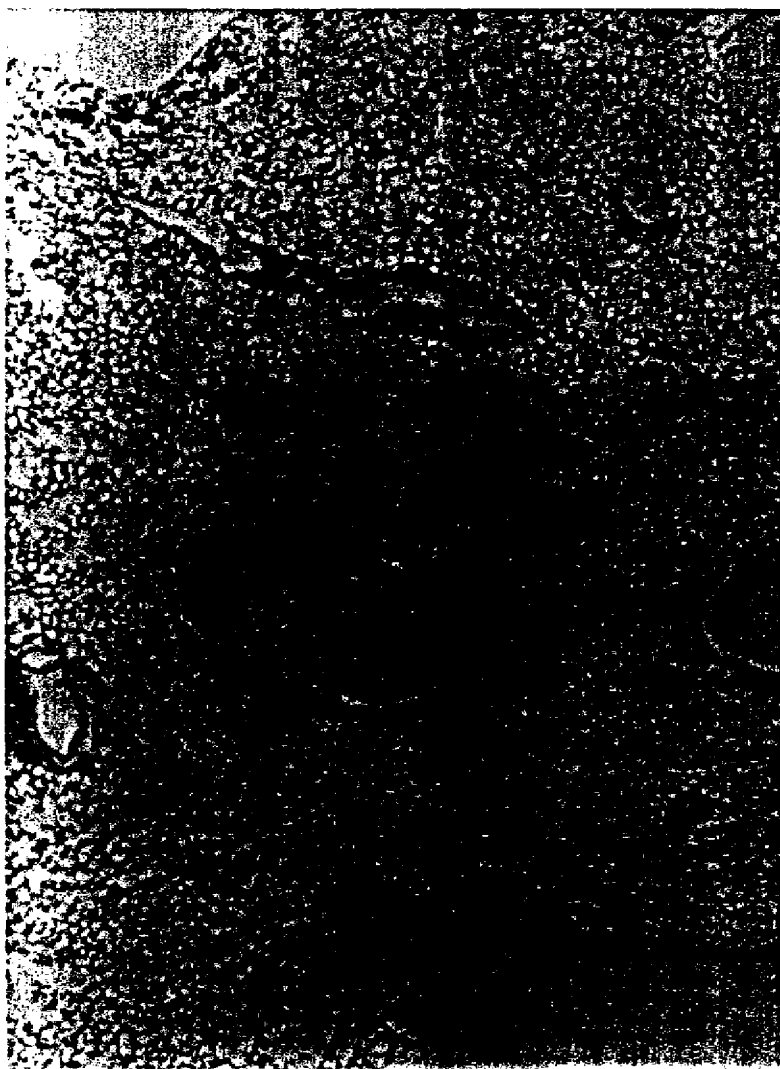


図 3 9

【图40】



图 4 0

【图 4 1】

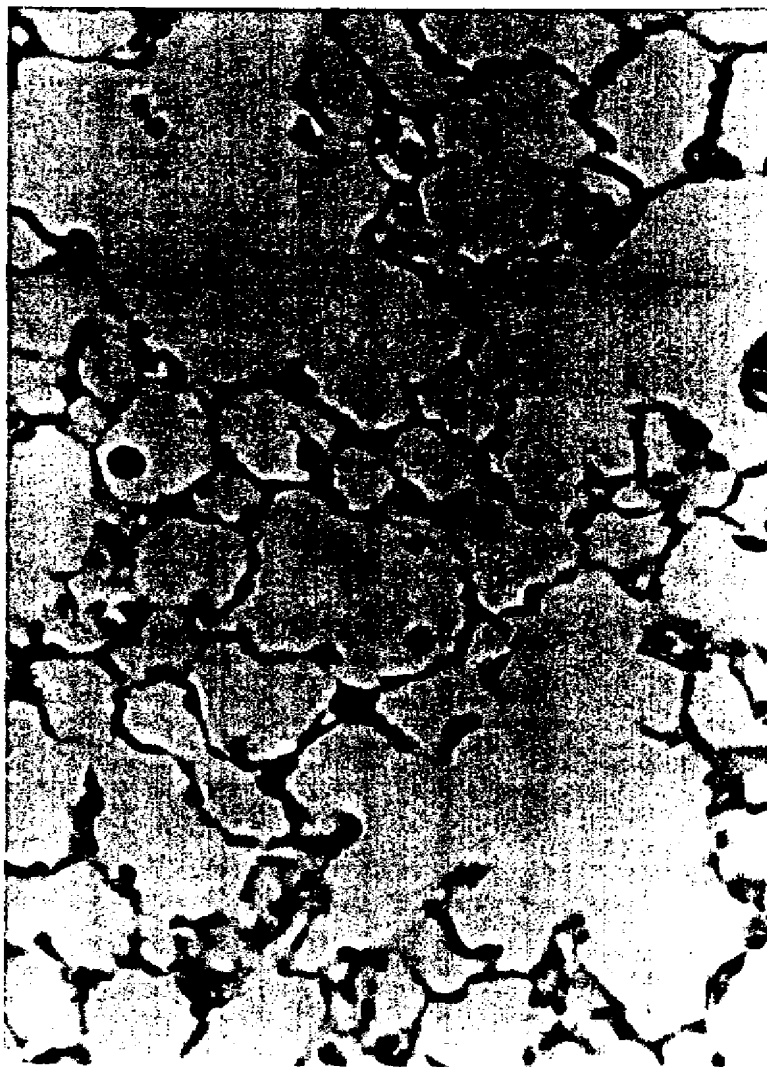


图 4 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 96/11033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 23865 (GENENTECH, INC.) 8 September 1995 see the whole document ---	1-28
P,X	THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, vol. 99 (suppl 6B), 29 December 1995, pages 85-135, XP000603756 STOCKLEY, R.A.: "Role of inflammation in respiratory tract infections" see the whole document ---	1-28
A	WO,A,92 04372 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 19 March 1992 cited in the application see the whole document ---	1-28
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 October 1996		05. 11. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Olsen, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 96/11033

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 01054 (GIST-BROCADES N.V.) 23 January 1992 see the whole document ---	1-28
A	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 267, no. 2, 1994, pages L137-L144, XP000603427 BOYLAN, A.M. ET AL.: "Interleukin-8 is a major component of pleural liquid chemotactic activity in a rabbit model of endotoxin pleurisy" see the whole document ---	1-28
A	NATURE, vol. 365, 1993, pages 654-657, XP000604920 SEKIDO, N. ET AL.: "Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8" cited in the application see the whole document ---	1-28
A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 150, 1993, pages 5585-5595, XP000604925 MULLIGAN, M.S. ET AL.: "Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody" cited in the application see the whole document ---	1-28
A	AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE, vol. 146, 1992, pages 825-830, XP000603436 BROADDUS, V.C. ET AL.: "Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema" see the whole document ---	1-28
A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 89, 1992, pages 1257-1267, XP000603440 BOYLAN, A.M. ET AL.: "Evidence of a role for mesothelial cell-derived interleukin 8 in the pathogenesis of asbestos-induced pleurisy in rabbits" see the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/11033

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9523865	08-09-95	CA-A-	2181787	08-09-95
WO-A-9204372	19-03-92	AU-A-	8535791	30-03-92
		CA-A-	2091558	13-03-92
		EP-A-	0550528	14-07-93
WO-A-9201054	23-01-92	EP-A-	0491032	24-06-92
		US-A-	5234911	10-08-93

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 31/00	6 1 1	A 6 1 K 31/00	6 1 1
	6 1 7		6 1 7 E
	6 3 1		6 3 1 B
	6 3 7		6 3 7 E
	6 4 3		6 4 3 D
45/00		45/00	
// C 1 2 N 15/02	Z N A	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	Z N A C
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN			
(72)発明者 ムーリ, マーク ダブリュ			
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131			
サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート 1301			